

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

CHRISTIAN PRADO

**TRANSPLANTE DE MICROBIOTA EM MODELO
EXPERIMENTAL MURINO DE ENTEROCOLITE NEONATAL.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Dal-Pizzol

**CRICIÚMA
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

P896t Prado, Christian.

Transplante de microbiota em modelo experimental murino de enterocolite neonatal / Christian Prado. - 2017.

53 p. : il.; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2017.

Orientação: Felipe Dal-Pizzol.

1. Enterocolite necrosante. 2. Transplante de microbiota fecal. 3. Intestinos - Inflamação. I. Título.

CDD 23. ed. 616.34

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla – CRB 14/1101

Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC

CHRISTIAN PRADO

**TRANSPLANTE DE MICROBIOTA EM MODELO
EXPERIMENTAL MURINO DE ENTEROCOLITE NEONATAL.**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para obtenção do Grau de Mestre em Ciências da Saúde na área de Ciências da Saúde no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Criciúma, 07 de fevereiro de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Felipe Dal-Pizzol – Universidade do Extremo Sul Catarinense
Orientador

Prof. Dr. Paulo César Lock Silveira – Dr. Membro Relator -
Universidade do Extremo Sul Catarinense

Prof. Dra. Samira Valvassori – Dr. Membro Interno - Universidade do
Extremo Sul Catarinense

Professora Maria Marlene Pires – Dra. Membro Externo - Universidade
Federal de Santa Catarina

Christian Prado
Mestrando

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiopatologia Experimental do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Profº Dr. Felipe Dal Pizzol, por acreditar e contribuir significativamente para a realização deste projeto.

Aos meus colegas e equipe do FISIOPAT, principalmente a Dra. Pricila e a Msc Monique, por terem me ajudado na construção e realização do experimento.

A minha esposa, Raquel, por ter me incentivado a fazer a pós-graduação, ter tido paciência com minhas frustrações, e por não ter permitido que eu me entregasse as mesmas. Você é o amor que ilumina minha vida.

Aos professores do PPGCS, os quais me deram a base e instrumentos teóricos para a realização desse estudo, e me servem de inspiração para prosseguir na busca do conhecimento.

A UNESC por me acolher como professor e aluno, contribuindo para meu crescimento pessoal e científico.

RESUMO

A enterocolite necrosante é uma doença grave que acomete neonatos prematuros, provocando necrose parcial ou completa da parede gastrointestinal. Seu tratamento é realizado com antibióticos, nutrição parenteral, suporte avançado de vida, e em parte significativa dos casos também cirurgia. Apesar do desenvolvimento tecnológico em terapia intensiva neonatal, persiste causando mortalidade elevada, com até 50% de óbitos nos pacientes que necessitaram de tratamento cirúrgico. A microbiota intestinal tem um papel importante no desenvolvimento da doença, principalmente quando alterada, apresentando predomínio de bactérias patogênicas, ao que é chamado desbiose. Na busca de novas opções de tratamento, foi pesquisado se o transplante de microbiota de um doador saudável adulto previne, ou diminui, a resposta inflamatória em um modelo murino experimental de enterocolite necrosante. O experimento utilizou 71 ratos *Wistar*, divididos da seguinte forma: um rato adulto doador das fezes para o experimento, 10 ratos controle de 3 dias de vida amamentados por sua progenitora (grupo controle = GC), 20 ratos *Sham* submetidos a indução de enterocolite necrosante, (grupo *sham* = GS), 20 ratos que receberam transplante de microbiota antes da indução (transplante de microbiota pré = TMPE) e 20 ratos que receberam o transplante de microbiota após a indução (transplante de microbiota pós = TMPO). A indução da enterocolite seguiu metodologia já descrita, que envolve alimentação por fórmula artificial, hipotermia, hipóxia e administração de endotoxina por via oral. O transplante de microbiota foi realizado através da administração de 100µL da solução contendo 3×10^8 células, provenientes das fezes do rato doador adulto. Foram analisados a resposta inflamatória aguda através das dosagens dos níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6, a presença de dano oxidativo pelas técnicas de TBARS e carbonil. A presença de dano nitrosativo por Western blotting de 3-nitrotirosina. A avaliação do grau de lesão histológica na mucosa intestinal foi realizada através de escore desenvolvido por Caplan et al. Este escore varia de 0, que equivale a mucosa normal, até 4, o qual representa lesão transmural. O GS teve aumento significativo em relação ao GC dos níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6, na atividade da mieloperoxidase e equivalente MDA, e na de dosagem 3-nitrotirosina ($p < 0,05$). O TMPE teve redução significativa em relação ao GS em relação aos níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6 na atividade da mieloperoxidase e equivalente MDA, e na de dosagem 3-nitrotirosina ($p < 0,05$). O TMPO teve redução significativa em relação ao GS em relação aos níveis de IL-6, equivalente MDA, e na de

dosagem 3-nitrotirosina ($p<0,05$). Não houve variação significativa entre os grupos em relação a carbonilação de proteínas. No escore histológico de lesão intestinal, o GS apresentou valores maiores que os outros grupos, variando entre 1 e 3 ($p<0,05$). Os espécimes do GC, TMPE e TMPO apresentaram predominantemente escore 0, equivalente a mucosa normal, desta forma, sem diferença significativa entre si. O transplante de microbiota apresentou potencial terapêutico para o tratamento de enterocolite necrosante, principalmente na prevenção, quando realizada precocemente, no modelo experimental de indução da doença.

Palavras-chave: enterocolite necrosante; transplante de microbiota fecal; resposta inflamatória; dano oxidativo.

ABSTRACT

Necrotizing enterocolitis is a serious disease that affects premature neonates, causing partial or complete necrosis of the gastrointestinal wall. Its treatment is performed with antibiotics, parenteral nutrition, advanced life support, and in part significant of cases also surgery. In spite of the technological development in neonatal intensive care, it persists causing high mortality, with up to 50% of deaths in the patients that needed surgical treatment. The intestinal microbiota plays an important role in the development of the disease, especially when it is altered, presenting a predominance of pathogenic bacteria, which is called dysbiosis. In the search for new treatment options, it was investigated whether microbiota transplantation from a healthy adult donor prevented, or decreased, the inflammatory response in an experimental murine model of necrotizing enterocolitis. The experiment used 71 Wistar rats, divided as follows: one adult faecal donor mouse for the experiment, 10 control mice of 3 days of age breastfed by their parent (control group = GC), 20 Sham rats submitted to induction of necrotizing enterocolitis (Sham group= GS), 20 mice receiving microbiota transplantation prior to induction (pre-microbiota transplantation= TMPE) and 20 mice receiving microbiota transplantation after induction (post-microbiota transplantation= TMPO). The induction of enterocolitis followed the previously described methodology, which involves feeding by artificial formula, hypothermia, hypoxia and oral endotoxin administration. The microbiota transplantation was performed by administering 100µL of the solution containing 3×10^8 cells from the feces of the adult donor rat. The acute inflammatory response was analyzed by the levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6, the presence of oxidative damage by the TBARS and carbonyl techniques. The presence of nitrosative damage by Western blotting of 3-nitrotyrosine. The evaluation of the degree of histological lesion in the intestinal mucosa was performed through a score developed by Caplan et al. This score ranges from 0, which is equivalent to normal mucosa, up to 4, which represents transmural injury. The GS had a significant increase in the GC levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6, in the activity of myeloperoxidase and MDA equivalent, and in the dose of 3-nitrotyrosine ($p < 0.05$). TMPE was significantly reduced in relation to GS in relation to levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in myeloperoxidase activity and MDA equivalent, and in the 3-nitrotyrosine dosage ($p < 0.05$). TMPO had a significant reduction compared to GS in relation to IL-6 levels, MDA equivalent, and 3-nitrotyrosine dosage ($p < 0.01$).

There was no significant variation between groups in relation to protein carbonylation. In the histological score of intestinal lesion, GS presented higher values than the other groups, ranging from 1 to 3 ($p < 0.05$). GC, TMPE and TMPO specimens showed predominantly 0 score, equivalent to normal mucosa, in this way, with no significant difference between them. Transplantation of microbiota presented therapeutic potential for the treatment of necrotizing enterocolitis, mainly in the prevention, when performed early, in the experimental model of induction of the disease.

Key words: necrotizing enterocolitis; fecal microbiota transplantation; Inflammatory response; Oxidative damage.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAT– catalase

CD14 – do inglês: cluster of differentiation 14 - grupo de diferenciação

COX-2– ciclooxigenase 2

EGF – do inglês: *epidermal growth factor*- fator de crescimento epidérmico

eNOS – do inglês: *endothelial nitric oxide synthase*- sintase endotelial de óxido nítrico

ERN – Espécies Reativas de Nitrogênio

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

FMT – do inglês: *fetal microbiota transplant* - transplante de microbiota fecal

FPRs– do inglês: *formyl peptides receptors*- receptores formil-peptídeo

GPX – Glutathione Peroxidase

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

HB-EGF– do inglês: *heparin-binding EGF-like growth factor*- fator de crescimento semelhante ao EGF ligado à heparina

IL – interleucina

IKB – fator de transcrição I-kappa-B

iNOS – do inglês: *nitric oxide synthase inducible*- sintase induzível de óxido nítrico

LPS– lipopolissacarídeo

MAMP– do inglês: *microbial-associated molecular patterns*- padrões moleculares associados a micróbios

MD2– do inglês: *myeloid differentiation protein 2*- proteína de diferenciação mielóide 2

MPO – mieloperoxidase

NEC –do inglês: *necrotizing enterocolitis*- enterocolite necrosante

NFkB – do inglês: *nuclear factor kappa B*- fator nuclear kappa B

nNOS – do inglês: *nitric oxide synthase neuronal*- sintase neuronal de óxido nítrico

NODs – do inglês: *nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors*- receptores semelhantes ao domínio de oligomerização ligante a nucleotídeo

O₂⁻ - ânion superóxido

ON – Óxido Nítrico

ONOO⁻ - peroxidonitrito

PAF - do inglês: *platelet-activating factor*- fator de ativação plaquetária

PAMP - do inglês: *pathogen-associated molecular patterns*- padrões moleculares associados a patógenos

PRR - do inglês: *pattern recognition receptors*- receptores de reconhecimentos de padrão

RN – Recém-nascido

RNA – do inglês: *ribonucleic acid*- ácido ribonucleico

SOD – superóxido dismutase

TMPE - transplante de microbiota pré-exposição

TMPO - transplante de microbiota pós-exposição

TNF- α – do inglês: *tumor necrosis factor α* - fator de necrose tumoral α

TLR4 - receptores do tipo Toll-like 4

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

UTINeo - Unidade de Terapia Intensiva neonatal

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	Erro! Indicador não definido.1
1.1. ENTEROCOLITE NECROSANTE.....	Erro! Indicador não definido.1
1.2. O PAPEL DA BARREIRA MUCOSA INTESTINAL NA NEC.....	14
1.3. O PAPEL DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO NA NEC.....	15
1.4. OS MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NA NEC.....	17
1.5 OS RECEPTORES DE RECONHECIMENTO DE PADRÕES NA NEC.....	17
1.6. A MICROBIOTA E SEUS EFEITOS.....	19
2. OBJETIVOS.....	Erro! Indicador não definido.3
2.1. OBJETIVO GERAL.....	233
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	233
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	Erro! Indicador não definido.4
3.1. ANIMAIS.....	24
3.2. INDUÇÃO DE ENTEROCOLITE E TRATAMENTOS.....	244
3.3. DESENHO EXPERIMENTAL.....	255
3.4. NÍVEIS DE CITOCINAS.....	266
3.5. ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE.....	266
3.6. DOSAGEM DE 3-NITROTIROSINA POR WESTERN BLOTTING.....	277
3.7. NITRITO/NITRATO.....	277
3.8. DANO OXIDATIVO (TBARS E CARBONIL).....	287
3.9. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	288
3.10. HISTOLOGIA.....	288

3.11.	ANÁLISE
ESTATÍSTICA.....	299
4. RESULTADOS	30
4.1. RESPOSTA INFLAMATÓRIA.....	30
4.2 DANO OXIDATIVO E NITROSATIVO.....	31
4.3. NÍVEIS DE	
NITROTIROSINA.....	332
4.4. LESÃO HISTOLÓGICA.....	33
5. DISCUSSÃO	35
6. CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	44
APÊNDICES.....	52

1 INTRODUÇÃO

1.1. ENTEROCOLITE NECROSANTE

A Enterocolite Necrosante (NEC) é uma doença multifatorial que acomete o trato gastrointestinal do recém-nascido (RN), provocando necrose parcial ou completa da parede gastrointestinal (de Souza, 2008; Besner, 2015). Acomete principalmente neonatos prematuros, atingindo 10% dos recém-nascidos com menos que 1500 gramas, sendo que de 20 a 30% destes não sobrevivem (Bergholz et al., 2013; Hogberg et al., 2013; Karadag et al., 2015; Yu et al., 2015). A medida que a sobrevivência dos prematuros extremos continua a aumentar, a incidência de prematuridade e as complicações da mesma, como enterocolite necrosante, também estão aumentando (Mollen et al., 2008; Radulescu et al., 2009).

A doença ocorre em 90% dos casos nos primeiros 10 dias de vida, sendo que o risco de ser acometido é inversamente proporcional ao peso e idade gestacional (de Souza, 2008; Coran, 2012; Hogberg et al., 2013; Besner, 2015). Inicialmente apresenta sintomatologia compatível com qualquer quadro séptico sistêmico no RN, desenvolvendo letargia, instabilidade térmica, vômitos ou resíduo gástrico bilioso, apnéia, bradicardia, hipoglicemia e choque (de Souza, 2008; Coran, 2012; Benkoe et al., 2014a). A medida que a doença progride, sinais e sintomas clínicos vão sendo direcionados para o quadro abdominal, com o paciente podendo apresentar enterorragia, distensão abdominal, massas palpáveis, e eritema de parede abdominal. Laboratorialmente o neonato pode apresentar leucopenia, trombocitopenia, e acidose metabólica progressiva (de Souza, 2008; Coran, 2012; Benkoe et al., 2014a).

Quando o diagnóstico de provável NEC é considerado, a confirmação com imagem radiológica é fundamental, pois o padrão ouro para o diagnóstico é a presença de pneumatose intestinal. Radiologicamente, a pneumatose intestinal representa a presença de pequenas bolhas de gás na parede intestinal, a qual corresponde a hidrogênio, subproduto do metabolismo bacteriano. Frequentemente ausente no início do quadro clínico, onde radiologicamente só é identificado a distensão de alças intestinais, a sua presença confirma o diagnóstico de NEC (de Souza, 2008; Coran, 2012; Benkoe et al., 2014a).

Após a suspeita clínica e laboratorial, associada ou não a confirmação radiológica, o paciente é colocado em jejum, recebe

antibioticoterapia de amplo espectro, é iniciado o suporte avançado de vida com uso de nutrição parenteral, vasopressores e ventilação mecânica (de Souza, 2008; Coran, 2012; Besner, 2015). O RN é acompanhado radiologicamente a intervalos de 6 a 12 horas, onde se buscam sinais de lesão transmural, a qual vai ser representada por pneumoperitônio (de Souza, 2008; Coran, 2012). Ausente este sinal, o tratamento NEC é clínico, com as medidas antes descritas de suporte, até que haja melhora clínica, e laboratorial, sendo reintroduzida a alimentação.

Quando há a presença de pneumoperitônio, a intervenção cirúrgica é mandatória, com ressecção do intestino acometido, e a criação de ostomias (de Souza, 2008; Coran, 2012). A porção de intestino acometido pode ser limitada, frequentemente o íleo, quando é considerada focal. Pode ser multissegmentar acometendo menos de 50% intestino delgado, e paneterocolite, quando atinge mais de 75% do intestino delgado e cólon (Coran, 2012). Os casos em que a ressecção envolve 50% ou mais do intestino delgado levam frequentemente a síndrome do intestino encurtado, com necessidade de complementação nutricional parenteral por meses, anos ou até definitivamente (Coran, 2012).

O padrão histológico da NEC é de necrose de coagulação ou isquêmica, correspondendo a necrose tecidual com perda do detalhe celular, com preservação “fantasma” da estrutura celular e tecidual, as vilosidades mantêm o arcabouço, ainda que acelulares. Identifica-se também no tecido: ulceração, inflamação, hemorragias, alterações regenerativas (regeneração epitelial, tecido de granulação e fibrose), presença de bactérias no lúmen e na parede intestinal, pneumatose intestinal (submucosa e/ou serosa), edema submucoso, abscesso de criptas, pseudomembranas e hipercrecimento fúngico (de Souza, 2008; Özdemir et al., 2011; Coran, 2012).

A despeito de significativas melhoras no atendimento de terapia intensiva neonatal (UTINeo), nos últimos 20 anos não houve melhora significativa na mortalidade dos paciente com NEC (Benkoe et al., 2014a). É uma doença que possui na melhor das hipóteses uma sobrevida de 70% nos pacientes, enquanto nos que foram submetidos a ressecção cirúrgica do intestino acometido, ao redor de 50% (Feng et al., 2007; de Souza, 2008; Mollen et al., 2008; Hogberg et al., 2013; Bergholz et al., 2013; Besner, 2015). É também a maior causadora de intestino encurtado na criança, levando necessidade de nutrição parenteral prolongada ou definitivamente, a qual por si só, possui uma mortalidade ainda mais significativa em 10 anos (Feng et al., 2007;

Carlisle et al., 2013; Hogberg et al., 2013; Besner, 2015). Os principais tratamentos disponíveis hoje se restringem a antibióticos, cirurgia, e suporte avançado de vida, até que a resposta inflamatória e a necrose cessem (de Souza, 2008; Coran, 2012). Em virtude disso, a pesquisa em relação a patogênese da doença e a prevenção da mesma, tem sido o principal objetivo de muitos pesquisadores (Besner, 2015; Karadag et al., 2015).

1.2 O PAPEL DA BARREIRA MUCOSA INTESTINAL NA NEC

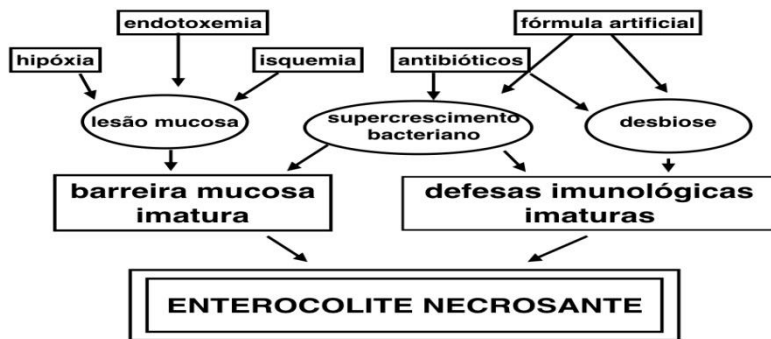
O período neonatal é caracterizado por importante susceptibilidade a infecções e uma resposta inflamatória exagerada (Rentea et al., 2013; Yu et al., 2015). Além da prematuridade, encontram-se reconhecidos universalmente 3 fatores para o desenvolvimento da doença: episódios de isquemia-reperusão devido a instabilidade hemodinâmica do RN, colonização bacteriana anormal, conhecida como desbiose, e exposição a fórmulas artificiais (Feng et al, 2006; Feng et al, 2007; de Souza, 2008; Bergholz et al., 2013). Apesar disso, a maioria dos RN com um ou até os três fatores não desenvolvem a doença, demonstrando que a etiologia é bastante complexa (de Souza, 2008). Os dados empíricos e experimentais até o momento sugerem que a NEC ocorre em um neonato prematuro vulnerável, que sofre um insulto ou invasão bacteriana no trato gastrointestinal imaturo, nas quais a função de barreira mucosa e a imunomodulação estão alteradas (Feng, 2007; Özdemir et al., 2011; Coran, 2012; Karadag et al., 2015).

A barreira mucosa intestinal é formada pelo epitélio intestinal, o qual constitui uma barreira dinâmica ao transporte de microbianos e antígenos. Suas junções de oclusão, impedindo a passagem de bactérias são reguladas por vários gens como as claudinas, e de *gap junction protein* (Rentea et al., 2012; Hogberg et al., 2013; Tanner et al., 2015). Possuem seu próprio mecanismo de reparo e regeneração intestinal, a qual é realizada através da migração de enterócitos viáveis, e após, pela proliferação e diferenciação intestinal (Feng et al., 2007; de Souza, 2008). As glândulas exócrinas na superfície da mucosa intestinal secretam proteínas que realizam funções protetoras na ausência de anticorpos específicos, como lactoferrinas, lisozimas, peróxidos, angiogeninas, peptídeos trefoil, defensinas, fosfatase alcalina intestinal, creptinas e IgA polimérica (de Souza, 2008; Rentea et al., 2012; Rentea et al., 2013; Heinzerling et al., 2014). No lúmen intestinal, o próprio peristaltismo, acrescido das secreções gástricas e pancreatobiliares, além

do muco intestinal, rico em imunoglobulinas, diminuem o número de microorganismos viáveis e de antígenos (Perrone et al., 2010; Coran, 2012; Tanner et al., 2015).

O trato gastrointestinal no prematuro é caracterizado por imaturidade celular e humoral, com permeabilidade aumentada, função de barreira intestinal imatura, inervação incompleta com motilidade diminuída, diminuição das secreções gástricas, associado a redução na concentração de enzimas proteolíticas (Radulescu, 2009; Coran, 2012; Rentea et al., 2013; Besner, 2015). Aparentemente o comprometimento da barreira mucosa intestinal é o primeiro evento que leva a ativação da cascata inflamatória na NEC (Feng et al., 2007; Perrone et al., 2010; Özdemir et al., 2011; Besner, 2015; Karadag et al., 2015). Esse comprometimento pode ser iniciado por estressores fisiológicos perinatais, os quais primariamente ou secundariamente causam isquemia intestinal (Feng et al., 2007; Özdemir et al., 2011; Coran, 2012; Karadag et al., 2015).

Figura 1: Fisiopatologia da NEC



A NEC é uma doença multifatorial que ocorre predominantemente em RN prematuros. A associação de hipoperfusão intestinal, defesas imunológicas imaturas, e uma microbiota alterada devido a fórmulas alimentares artificiais e antibióticos, acabam por romper a barreira mucosa do RN, levando a NEC.

1.3. O PAPEL DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO NA NEC

O RN prematuro sofre com frequência episódios de hipóxia, hipotensão e hipotermia, os quais causam isquemia intestinal (Feng et al., 2007; Özdemir et al., 2011; Coran, 2012; Karadag et al., 2015). Na isquemia, a xantina desidrogenase gerada pelo metabolismo anaeróbio, é transformada em xantina oxidase. Durante a reperfusão, a xantina oxidase utiliza o oxigênio molecular como aceptor final de elétrons. Na reação da hipoxantina-xantina, catalisada pela enzima, os elétrons são transferidos para o oxigênio, produzindo ânion superóxido (O_2^-), um radical livre. O O_2^- sofre, por reação enzimática com a superóxido dismutase (SOD), dismutação em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). (Halliwell e Gutteridge, 1999). Essas espécies reativas de oxigênio vão causar lesões nas membranas celulares e mitocondriais, as quais vão provocar áreas desnudadas de epitélio nas extremidades apicais das vilosidades, onde as bactérias podem atravessar a barreira mucosa (Özdemir et al, 2011; Karadag et al, 2015; Besner, 2015).

Outro mecanismo de lesão por radicais livres na barreira mucosa intestinal envolve o óxido nítrico (ON), uma espécie reativa de nitrogênio, produzido pela sintetase de ON (NOS), a qual catalisa a oxidação do aminoácido L-arginina, liberando citrulina e ON. Existem 3 isoformas da sintetase do óxido nítrico: neuronal (nNOS), endotelial (eNOS), e a forma induzível (iNOS). Enquanto as primeiras são reguladas pelo fluxo de cálcio intracelular, a última é induzida por citocinas, fatores de crescimento e inflamação (Feng et al, 2006; de Souza, 2008; Rentea et al, 2013). A expressão e atividade do iNOS normalmente são baixas, mas podem aumentar até 15 vezes quando estimuladas por lipopolissacarídeo (LPS), causando a liberação de altos níveis de óxido nítrico (Feng et al., 2006; Özdemir et al., 2011). O LPS constitui parte da membrana celular das bactérias Gram-negativas. O neonato tem uma resposta exagerada e sustentada na produção de iNOS secundária a NEC (Feng et al., 2006; Özdemir et al., 2011; Rentea et al., 2013; Heinzerling et al, 2014).

O ON pode lesar a barreira mucosa diretamente pela apoptose de enterócitos e pela inibição do reparo celular. Embora o óxido nítrico tenha vida curta, sua principal reação biológica deletéria está relacionada à criação do peroxidonitrito ($ONOO^-$), fruto de sua combinação com o superóxido gerado nos locais inflamatórios. O $ONOO^-$ é um potente oxidante com potencial de peroxidação lipídica e lesão de membranas celulares. A hiperexpressão sustentada de ON e provavelmente de $ONOO^-$, medeiam a morte celular diretamente pela interrupção da função mitocondrial e inibição da respiração celular. O $ONOO^-$ pode induzir apoptose acelerada nas vilosidades intestinais e

impedir a cicatrização da mucosa, tanto inibindo a migração quanto a proliferação dos enterócitos, bem como interrompendo a cascata de sinalização dos mecanismos de reparo tecidual (Feng et al., 2006; Özdemir et al, 2011; Coran, 2012).

A administração de superóxido dismutase (SOD), glutatona e Dexpantenol (um análogo do ácido pantotênico) (Karadag et al., 2015), solução salina rica em hidrogênio (Sheng et al., 2013), acetilcisteína (Ozdemir et al., 2012), *ginkgo biloba* (Özdemir et al, 2011) e resveratrol (Ergun et al., 2007), reduzem a severidade da NEC, promovendo e provendo sistemas celulares antioxidantes, incluindo a glutatona peroxidase (GPX), catalase (CAT), SOD, e outras reações enzimáticas. Estes efeitos são demonstrados em modelos murinos, nos quais, além de protegerem da lesão intestinal induzida por LPS, ou outras formas de indução de injúria intestinal no experimento, apresentam efeitos anti-inflamatórios, diminuindo a expressão de interleucinas (IL) pró-inflamatórias e ciclooxygenase 2 (COX-2).

1.4. OS MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NA NEC

Os mediadores inflamatórios tem um papel crítico no desenvolvimento de NEC, aumentando a permeabilidade da membrana intestinal, permitindo a translocação de bactérias e toxinas, levando ao colapso da integridade da mucosa intestinal (Coran, 2012; Karadag et al., 2015). A ruptura da barreira epitelial resulta primariamente de apoptose, iniciada por citocinas, toxinas e produtos bacterianos (Rentea et al., 2013; Bergholz et al., 2013). Vários mediadores inflamatórios demonstraram, em estudos experimentais, causar apoptose, como ON, LPS, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e fator de ativação plaquetária (PAF) (Coran, 2012; Maretta et al., 2014; Zhou et al., 2014). A utilização de inibidores de pan-caspases reduzem o grau de lesão epitelial e a incidência de NEC em modelos experimentais (Coran, 2012). Bem como a administração de fatores de crescimento, especificamente, fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento epidérmico ligante a heparina (HB-EGF), demonstraram forte efeito terapêutico em modelos experimentais, inibindo a apoptose (Feng et al., 2006; Feng et al., 2007; Radulescu et al., 2010a; Radulescu et al., 2010b; Besner, 2015).

A COX-2 é a enzima que catalisa o metabolismo do ácido araquidônico em prostaglandinas, leucotrienos e tromboxano. Normalmente é indetectável na maioria dos tecidos, a não ser quando

em processos inflamatórios intestinais, como a NEC (de Souza, 2008; Karadag et al., 2015). A expressão de COX-2 é aumentada pelas citocinas pró-inflamatórias como interleucina 1 (IL1), interleucina 6 (IL6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). A expressão de IL1, IL-6, interleucina 8 (IL-8), TNF- α e COX-2 são utilizadas como marcadores da intensidade da lesão na NEC (de Souza, 2008; Hogberg et al., 2013; Bergholz et al., 2013; Rentea et al., 2013; Benkoe et al., 2014a; Benkoe et al., 2014b; Heinzerling et al., 2014; Karadag et al., 2015). Experimentos em modelo murino demonstraram que o rato neonatal possui uma resposta inflamatória aumentada e prolongada, em episódios de isquemia e reperfusão comparados com ratos adultos (Yu et al., 2015).

1.5 OS RECEPTORES DE RECONHECIMENTO DE PADRÕES NA NEC

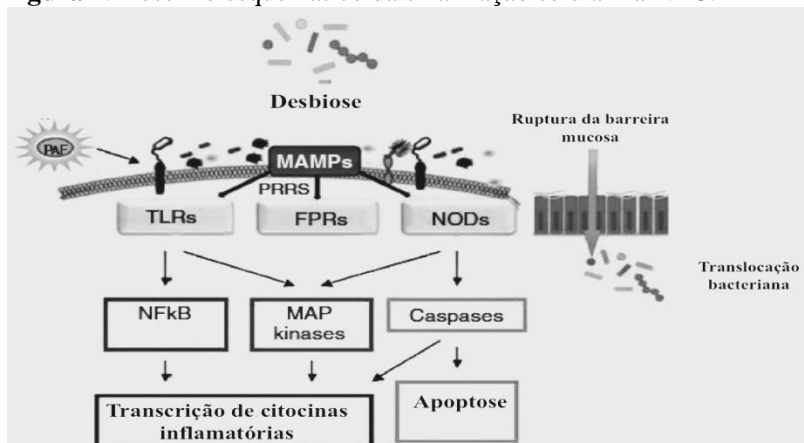
Quando agentes infecciosos entram em contato com a barreira mucosa intestinal, e eventualmente a ultrapassam, acabam entrando em contato com a população de células da imunidade inata, como macrófagos e células dendríticas residentes (Janeway et al., 2002). A interação dessas células com os agentes infecciosos ocorre por intermédio dos receptores de reconhecimento de padrão (PRR) que, por sua vez, reconhecem os padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) (Janeway et al., 2002; Coran, 2012; Tanner et al., 2015) . Os PAMP são estruturas conservadas evolutivamente e essenciais para sobrevivência dos microorganismos. Como exemplo a flagelina (componente do flagelo bacteriano), LPS, zimosan (componente da parede celular de fungos), dsRNA (RNA dupla fita, comum em alguns vírus), dentre outros (Janeway et al., 2002; Tanner et al., 2015). Quando ocorre a interação PAMP-PRR, ocorre a liberação de sinais celulares que culminam na indução da transcrição de genes importantes para ativação celular e resposta inflamatória (Janeway et al., 2002). Diferentes PRR são expressos numa mesma célula, o que faz com que esta tenha a capacidade de reconhecer várias classes de microorganismos.

Entre os PRR, os que estão envolvidos diretamente com a NEC são os receptores toll-like (TLR) (de Souza, 2008; Mollen et al., 2008; Tatum et al., 2010; Coran, 2012). O receptor TLR é expresso nas células epiteliais, possuindo um papel importante na defesa da mucosa. Desta família, o TLR4 é o primeiro identificado das moléculas de TLR transmembranas. Os LPS constituem parte da membrana celular de

todas as bactérias Gram-negativas, o contato do LPS com TLR4, desencadeia resposta inflamatória e imunológica (Tatum et al., 2010; Heinzerling et al., 2014; Zhou et al., 2014). Em modelos murinos foi demonstrado que o TLR4 e os correceptores CD14 e MD2 possuem um papel importante na apresentação e sinalização para o desenvolvimento de NEC, ratos *knockout* são aparentemente protegidos de desenvolver NEC (Mollen et al., 2008; Carlisle et al., 2013).

Os TLR iniciam uma cascata intracelular de sinalização, levando à degradação do inibidor de IKB, translocação do fator nuclear kB (NF-kB) e ativação transcricional de genes de resposta pró-inflamatória (de Souza, 2008; Mollen et al., 2008; Zhou et al., 2014). O NFkB é um fator de transcrição com papel chave na regulamentação de vários genes pró-inflamatórios nos enterócitos. Sua ativação é regulada negativamente pelo IKB, que o retém no citoplasma, prevenindo a transcrição nuclear. Nos recém-nascidos prematuros se encontra uma expressão reduzida de IKB, como resultado, suas células epiteliais podem apresentar inflamação excessiva quando a rota TLR é ativada por bactérias patogênicas (Feng et al, 2006; de Souza, 2008; Zhou et al., 2014). A estimulação da célula por citocinas, endotoxinas e produtos bacterianos, leva a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, os quais vão ativar a IKB quinase. Essa quinase ao fosforilar a IKB, libera o NF-kB para o núcleo, onde o mesmo ativa a transcrição de genes pró-inflamatórios, demonstrando um processo de retroalimentação que potencializa a lesão celular (de Souza, 2008; Karadag et al, 2015; Tanner et al., 2015).

Figura 2: Desenho esquemático da sinalização celular na NEC:



Os PRR reconhecem os PAMPs, aqui descritos como MAMPs, do inglês: *microbial-associated molecular patterns*- padrões moleculares associados a micróbios. Os TLRs degradam o inibidor de IKB, permitindo a translocação nuclear do NF-κB, o qual vai ativar a transcrição de citocinas pró-inflamatórias. São apresentados outros PRR, como o FPRs (do inglês: *formyl peptides receptors*- receptores formil-peptídeo) e NODs (do inglês: *nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors*- receptores semelhantes ao domínio de oligomerização ligante a nucleotídeo), atuam nas MAP kinases e caspases, levando à apoptose. Adaptado de Coran, 2012.

1.6. A MICROBIOTA E SEUS EFEITOS

O ambiente intestinal do recém-nascido é considerado estéril ao nascimento, os microorganismos do ambiente, do parto e do leite materno vão formar sua microbiota, que é composta de bactérias Gram-positivas e anaeróbios não formadores de esporos (bifidobactérias e lactobacilos) nas primeiras duas semanas de vida (de Souza, 2008; Feng et al., 2007). Esse microbioma por sua vez, ao interagir com os TLRs, vai permitir que a célula desenvolva tolerância, trazendo o equilíbrio entre os estímulos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios (Berrington et al., 2014). O microbioma intestinal afeta a expressão de mucina, a permeabilidade da mucosa, secreção de IgA, peptídeos antibacterianos, bem como a expressão de citocinas pela mucosa intestinal (Wang et al., 2009; Burke et al., 2013; Berrington et al., 2014).

Nenhum organismo isoladamente foi implicado como o causador da NEC, e acredita-se que uma colonização anormal do trato

gastrointestinal pode ter um papel fundamental no seu desenvolvimento (Sim et al., 2014). Desregulação deste sistema, chamada de desbiose, devido ao ambiente da UTI com predomínio de bactérias patogênicas e uso de antibióticos, está relacionada ao desenvolvimento de NEC (Wang et al., 2009; Torazza et al., 2013; Burke et al., 2013; Carlisle et al., 2013; Berrington et al., 2014; Heinzerling et al., 2014; Patole et al., 2014). Membros das famílias das enterobactérias (principalmente *Escherichia Coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia*), clostrídios, enterococos e estafilococos coagulase-negativos têm sido associados à doença. Em alguns estudos são demonstrados o predomínio de *Clostridium* e *Klebsiella* (Tatum et al., 2010; Torazza et al., 2013; Patole et al., 2014; Sim et al., 2014). Em epidemias em UTI neonatais, os germes mais prevalentes costumam ser: *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, espécies de *Clostridium* e de *Salmonella* (Bjorkstrom et al., 2009). Recentemente tem se observado que há uma mudança no padrão de colonização intestinal que precede o quadro clínico de NEC, sem modificar a quantidade total de bactérias, com predomínio de proteobactérias (*Escherichia coli*) e actinobactérias (bifidobactérias), com diminuição de sua diversidade, antes do início do quadro clínico (Torazza et al., 2013; Jenke et al., 2013; Carlisle et al., 2013; Patole et al., 2014; Tanner et al., 2015). Em um estudo prospectivo sobre o desenvolvimento da microbiota de gêmeos, foi identificado apenas um caso de NEC, o qual, comparado com o gêmeo sadio, apresentou uma mudança no padrão microbiano, com redução da diversidade e predominância de *Escherichia sp* (Stewart et al., 2013).

O leite materno é reconhecido universalmente como um fator de proteção para a NEC. Apresenta uma fórmula osmolarmente mais adequada ao RN, a qual permite o desenvolvimento de comensais microbianos, trazendo várias substâncias protetoras como imunoglobulinas e relaxinas (de Souza, 2008; Matheson et al., 2014; Patole et al., 2014). Vários experimentos e técnicas para induzir NEC em modelos animais, exploram a utilização de fórmulas artificiais como responsáveis pela mesma (Feng et al., 2006; Radulescu et al., 2010a; Hogberg et al., 2013; Bergholz et al., 2013).

Identificando o papel de bactérias patogênicas na NEC e os papéis protetores do leite materno, uma alternativa de tratamento seria estimular a colonização intestinal, em RNs em uso de fórmula artificial, com probióticos. Probióticos são microorganismos vivos, não patogênicos, que colonizam o intestino e conferem benefícios ao hospedeiro. Eles atuam no intestino promovendo imunomodulação, contribuem nutricionalmente, impactam positivamente na função motora

intestinal e na resistência a bactérias patogênicas (Tatum et al., 2010; Berrington et al., 2014). Muitos estudos têm comprovado o benefício da utilização de *Lactobacillus*, *Bifidobacteria* e *Sacharomyces*, além do *Streptococcus thermophilu*, na prevenção de NEC (Carlisle et al., 2013; Berrington et al., 2014; Dasopoulou et al., 2015). Já a Cochrane Review (2009), concluiu que não houve evidência de uma redução significativa da sepse nos estudos em seres humanos incluídos na revisão (Srinivasiois et al., 2009).

O transplante de microbiota fecal (em inglês: FMT), estratégia na qual é realizada a transferência de matéria fecal de pacientes sadios para pacientes com desbiose, com intuito de equilibrar essa flora, vem sendo utilizado em infecções como a colite pseudomembranosa (doença causada pelo *Clostridium difficile*) em pacientes com uso prolongado de antibióticos, principalmente em unidades de terapia intensiva (Burke et al., 2013). O tratamento convencional com uso de antibióticos cura cerca de 70% dos pacientes e aproximadamente 30% terão uma ou mais recorrências, com o FMT de voluntários sadios, a cura pode chegar a 90% (Burke et al., 2013). Esse tratamento vem sendo estudado em múltiplas doenças, desde doenças inflamatórias ou de motilidade intestinal (Berg et al., 2015), obesidade (Jayasinghe et al., 2016) , esteatose hepática não alcoólica (Konturek et al., 2015) e até diabetes tipo 2 (He et al., 2015). Pensando na importância do microbiota na barreira mucosa, é possível que esta técnica seja útil na prevenção da enterocolite necrosante em neonatos (De Curtis et al., 2013; Berrington et al., 2014).

A colonização intestinal por transplante de microbiota, embora utilizado como segunda linha de tratamento para colite pseudomembranosa, ainda carece de padronização na realização do mesmo (Burke et al., 2013; Berg et al., 2015; He et al., 2015; Konturek et al., 2015). Para o FMT realizado em seres humanos, geralmente de 50 a 600g de fezes são filtradas em igual quantidade de soro fisiológico, e o conteúdo diluído é administrado por sonda nasogástrica ou endoscopia (Burke et al., 2013; Berg et al., 2015; He et al., 2015; Konturek et al., 2015). A maioria dos pesquisadores acredita que 50 a 100g são suficientes (Konturek et al., 2015). Estudos em modelos animais são fundamentais para melhorar a eficácia clínica.

No estudo foram utilizados ratos neonatais já no primeiro dia de vida nascidos naturalmente. Alguns pesquisadores entendem ser melhor para o modelo de NEC, o nascimento dos espécimes por cesariana, prematuramente, com 21 dias de gestação (Feng et al., 2006). Outros pesquisadores entendem que devido a sua fisiologia e

desenvolvimento, os ratos com 1 dia de vida, nascidos à termo, apresentam similaridade ao desenvolvimento de um feto humano entre a 22^a e a 24^a semana de gestação, enquanto um rato de 3 dias corresponderia a um feto entre a 28^a e a 32^a semana de gestação (Ozdemir et al., 2011). Para o experimento foi provocado um insulto intestinal semelhante ao que ocorre na NEC, através de protocolo desenvolvido por Barlow et al., (1974), o qual consta da administração de dieta hiperosmolar, LPS, associado a períodos de hipotermia e hipóxia. Na pesquisa, foi realizado o transplante de microbiota antes e após o início do protocolo para o desenvolvimento de NEC.

A microbiota de neonatos internados em unidades de terapia intensiva, alimentados por fórmula artificial, é significativamente diferente dos pacientes amamentados, em ambiente domiciliares microbiologicamente menos hostis. O equilíbrio da microbiota, interagindo com os TLRs, evitando respostas inflamatórias exageradas, pode ser um meio de prevenção e até tratamento das enterocolites (Tatum et al., 2010; Carlisle et al., 2013; De Curtis et al., 2013). A hipótese em estudo é de que o transplante de microbiota de um doador adulto sadio previne ou diminui a resposta inflamatória em enterocolite necrosante. A partir destes dados podem-se criar novos métodos de prevenção ou tratamento da enterocolite necrosante baseados no transplante de microbiota neonatal.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar se o transplante de microbiota murino de um doador adulto tem potencial anti-inflamatório e antioxidante em um modelo de simulação de enterocolite necrosante.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar se o efeito do transplante de microbiota ocorre antes ou após o insulto;
- Avaliar o efeito do transplante de microbiota sobre a resposta inflamatória aguda através das dosagens dos níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6;
- Avaliar o efeito do transplante de microbiota sobre o dano oxidativo através da dosagem de TBARS e carbonil;
- Avaliar o efeito do transplante de microbiota sobre o dano nitrosativo através da dosagem de 3-nitrotirosina e níveis de nitrito/nitrato;
- Avaliar o efeito do transplante de microbiota sobre o grau de lesão histológica na mucosa intestinal.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Para este estudo foram utilizados 70 ratos de 1 dia de vida e 1 rato adulto saudável macho, de 12 semanas, da linhagem *Wistar*, fornecidos pelo Biotério da Unidade Acadêmica de Saúde – Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os ratos foram mantidos em ciclos de claro-escuro de ± 12 horas a uma temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade do ar controlada. A utilização dos animais seguiu o protocolo experimental nº 078/2016-1, aprovado pelo Comitê de ética da Universidade e os Princípios de Cuidados de Animais de Laboratório (Principles of Laboratory Animal Care, Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América, NIH, publicação numero 85-23, revisada em 1996). O número de animais em cada grupo foi baseado em estudos prévios (Besner et al., 2006) para uma diferença de até 30% nos parâmetros a serem analisados, com uma variância de no máximo 10% entre as médias calculou-se um tamanho de amostra, para um erro alfa de 0,05 e um poder de 80%. Desta foram 3 grupos de 20 animais, totalizando 60, e mais 10 animais de grupo controle. Foi utilizado um rato adulto de 12 semanas, o qual foi sacrificado e retirado material fecal do ceco para o experimento.

3.2. INDUÇÃO DE ENTEROCOLITE E TRATAMENTOS

Dos 70 ratos *Wistar* recém-nascidos, 60 foram separados de suas progenitoras no primeiro dia de vida e outros 10 foram amamentados naturalmente e mantidos com a mesma. Esse grupo de 10 animais foi considerado o controle. Os outros 60 ratos foram submetidos a sepse e lesão intestinal. Foi utilizado um (1) rato adulto saudável macho de 12 semanas, o qual foi sacrificado e retirado o material fecal do ceco para o experimento, comprimindo o mesmo com a mão e uma espátula.

Sepse foi induzida pela administração de LPS (2mg/kg) por gavagem via oral, uma única vez, 24 horas após o nascimento. Os animais então foram submetidos a ambiente de hipóxia em câmara de plexiglass infundida com nitrogênio 100% por 60 segundos, após foram expostos ao frio a 4°C por 10 minutos duas vezes ao dia, por até 2 dias, terminando esse protocolo, com aproximadamente 72h de vida, todos

foram submetidos a sacrifício por decapitação. Durante o protocolo, esses ratos, separados de sua progenitora, foram alimentados com fórmula artificial de Similac 1 (Abbot), 15 gramas diluídas em 75ml de Max Milk (Total Alimentos), fórmula que oferece 200 Kcal/Kg/dia. Os ratos foram alimentados com até 0,4ml da fórmula de 4 em 4 horas até o terceiro dia de vida. Esse protocolo foi descrito por Barlow et al., (1974) e Besner et al., (2006), envolvendo alimentação com fórmula artificial hiperosmolar, hipóxia, hipotermia e estímulo com endotoxina para simular a indução de enterocolite necrosante como processo multifatorial, da mesma forma que acontece no RN prematuro em UTINeo.

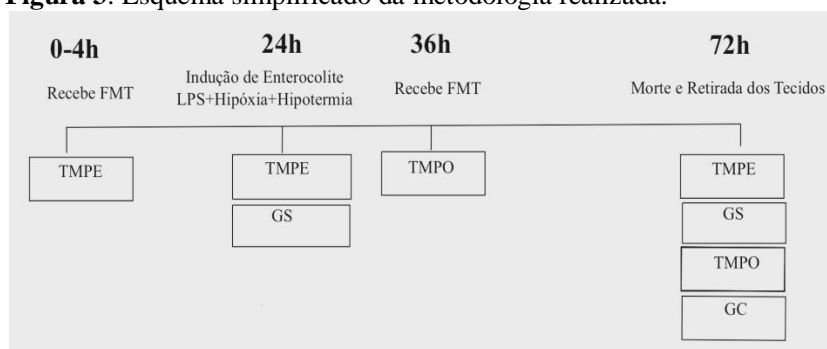
Para o transplante de microbiota fecal foi retirado de 1 grama de material fecal do ceco de um rato saudável adulto, comprimindo o mesmo com a mão e uma espátula, após o mesmo ser submetido a sacrifício por decapitação. Esse conteúdo foi homogeneizado em 10 ml de PBS estéril, filtrado com gaze, e centrifugado por 30 segundos a 3000 r.p.m. O valor da densidade óptica (DO) do sobrenadante foi analisado para identificar a concentração de bactérias por ml, sabendo por estudos anteriores que a DO igual a 0,5 equivale a 10^8 células (Li et al., 2015). Analisado a DO do material, a mesma foi equivalente a 3×10^8 células, foi então administrado 100µL da solução para cada rato neonatal uma única vez por gavagem. Esse método foi desenvolvido por Li et al. (2015) e Seekatz et al. (2015) e adaptado para nosso laboratório.

3.3. DESENHO EXPERIMENTAL

Três subgrupos foram divididos dos 60 animais que receberam fórmula hiperosmolar. O primeiro grupo de 20 animais foi identificado como grupo de transplante de microbiota pré-exposição (TMPE), esse grupo recebeu o transplante de microbiota logo após o nascimento, nas primeiras 4 horas de vida, após a primeira alimentação com fórmula artificial. Após 24 horas de vida foi iniciado o protocolo de indução de NEC, com LPS, hipóxia e hipotermia. O segundo grupo também de 20 animais foi identificado como grupo de transplante de microbiota pós-exposição (TMPO), recebendo o transplante de microbiota 12 horas após início do protocolo de indução da NEC, ou seja, 36 horas após o nascimento. E finalmente o terceiro grupo, de 20 animais, foi o grupo de indução de enterocolite sem transplante de microbiota, o grupo sham, (GS). Um grupo de 10 ratos amamentados naturalmente, grupo controle (GC), foi sacrificado no 3º dia de vida para as mesmas análises bioquímicas e histológicas dos demais grupos.

Os animais foram sacrificados após 72 horas ou antes caso apresentassem sinais clínicos de enterocolite como: sangue nas fezes, gasping ou distensão abdominal significativa. Após submetidos a sacrifício por decapitação, foram coletados o sangue, a porção íleo-terminal do intestino delgado e porção do ceco, que após limpo das fezes com solução salina 0,9%, foram congelados para análise da expressão das citocinas, dano oxidativo e nitrosativo. Parte deste material foi separado para estudo histológico, para graduação da lesão na mucosa intestinal.

Figura 3: Esquema simplificado da metodologia realizada:



Os animais foram divididos em grupo de transplante de microbiota pré-exposição (TMPE), recebendo o transplante de microbiota no primeiro dia de vida, após a primeira alimentação e antes da exposição ao LPS. O grupo de transplante de microbiota pós-exposição (TMPO), recebeu o transplante 12 horas após-exposição. O grupo sham, (GS), no qual recebeu LPS e todo o processo de indução de enterocolite, sem transplante de microbiota. E por fim o grupo controle (GC), sacrificado no 3º dia de vida.

3.4. NÍVEIS DE CITOCINAS

As concentrações de $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 nas estruturas, foram determinadas através da técnica de enzaimunoensaio (ELISA) em leitor de microplacas com a utilização de kit comercial (R&D System). A unidade de medida utilizada foi de pg/ml.

3.5. ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE

A atividade da mieloperoxidase é um indicativo do infiltrado de neutrófilos tecidual. Nesse sentido, o tecido foi

homogeneizado (50 mg/ml) em 0.5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio e centrifugado. A suspensão foi sonicada e alíquota do sobrenadante foi misturada com solução de 1.6 mM TMB e 1 mM H₂O₂. A atividade da MPO foi mensurada espectrofotometricamente em 650nm a 37°C. Os resultados foram expressos como mU/mg proteína (De Young et al., 1989).

3.6. DOSAGEM DE 3-NITROTIROSINA POR WESTERN BLOTTING

A formação de 3-nitrotirosina é uma forma amplamente utilizada de medição do dano proteico por espécies reativas de nitrogênio, sendo uma medida indireta do estresse nitrosativo. Os níveis protéicos de 3-nitrotirosina foram mensurados por *Western blotting* utilizando anticorpo específico (ABCam®). Para executá-lo as amostras foram homogeneizadas em tampão Laemmli (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1% (w/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS), 10% (v/v) de glicerol) e quantidades iguais de proteína (100 ug/poço) foram fracionados por eletroforese em gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose. A eficiência da eletrotransferência foi verificada por meio de coloração Ponceau S, e a membrana foi bloqueada em Tampão Tween-Tris salina (TTBS: 100 mM Tris-HCl, pH 7,5 contendo 0,9% de NaCl e 0,1% de Tween 20) com 5% de albumina. As membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com anticorpo policlonal de coelho anti-3-nitrotirosina (1:1000). Anticorpo secundário Anti-IgG de coelho foi incubado com as membranas durante 2 horas (1:10000), a membrana foi lavada novamente com TTBS, e a imunorreatividade foi detectada por quimioluminescência amplificada utilizando ECL. A análise densitométrica dos filmes foi realizada com o software Image J® v.1.34. Todos os resultados foram expressos como uma razão relativa entre 3-nitrotirosina e o imunoc conteúdo de proteína β -actina.

3.7. NITRITO/NITRATO

A concentração de nitrito/nitrato é um indicativo da quantidade de ON presente nas amostras. A concentração foi mensurada pela reação de Griess, lendo em absorbância de 550 nm usando leitor de microplaca. Resultados foram expressos como nmol/mg proteína (Green et al., 1982).

3.8. DANO OXIDATIVO (TBARS E CARBONIL)

A formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) durante uma reação ácido-aquecimento é amplamente adotado como um método sensível para a medição da peroxidação lipídica. Resumidamente, as amostras foram misturadas com 1 ml de ácido tricloroacético a 10% e 1 ml de 0,67% TBA. Posteriormente, estas aquecidas em banho de água fervente durante 30 min. Equivalentes ao malondialdeído (MDA) foram determinados por absorbância a 532 nm, utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como padrão externo. Os resultados serão expressos em equivalentes de MDA (nmol/mg de proteína) (Draper e Hadley 1990).

O dano oxidativo as proteínas foram avaliado por meio da determinação de grupamentos carbonil do conteúdo da amostra, com base na reação com dinitrofenilhidrazina (DNPH). Resumidamente, as proteínas foram precipitadas por adição de ácido tricloroacético a 20% e dissolveram-se em DNPH. A unidade de medida utilizada nmol/mg protein e a absorbância de 370 nm (Levine et al., 1990).

3.9. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

A quantidade total de proteínas de cada técnica foi medida usando o ensaio de proteína de Lowry. Reagente fenol de Folin foi adicionado a amostras de tecido, sua principal função é ligar-se a proteínas, onde ele é posteriormente reduzido. A alteração de cor resultante a partir de amarelo para azul pode ser seguido através da medição da absorbância a 700 nm. Albumina de soro bovino será utilizada como padrão de proteínas (Lowry et al., 1951).

3.10. HISTOLOGIA

Imediatamente após a morte, foram retiradas amostras da porção íleo-terminal do intestino delgado e também do ceco. As amostras foram lavadas com soro fisiológico e imediatamente após imersas em paraformaldeído a 4% onde permaneceram por 48 horas; após esse período os tecidos foram retirados e colocados em etanol 70% e armazenados para posterior análise histológica. Dos fragmentos dos tecidos foram confeccionadas as lâminas que forma coradas com hematoxila-eosina para posterior avaliação de dano tecidual. A graduação da lesão foi realizada por escore desenvolvido por Caplan et

al., (1994). Nesse sistema o grau 0 é considerado normal, sem lesão; o grau 1 quando há separação ou elevação da mucosa; grau 2 quando há edema e lesão da mucosa até o nível da metade da vilosidade intestinal; grau 3 quando há necrose de toda vilosidade intestinal e grau 4 quando há necrose transmural.

3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

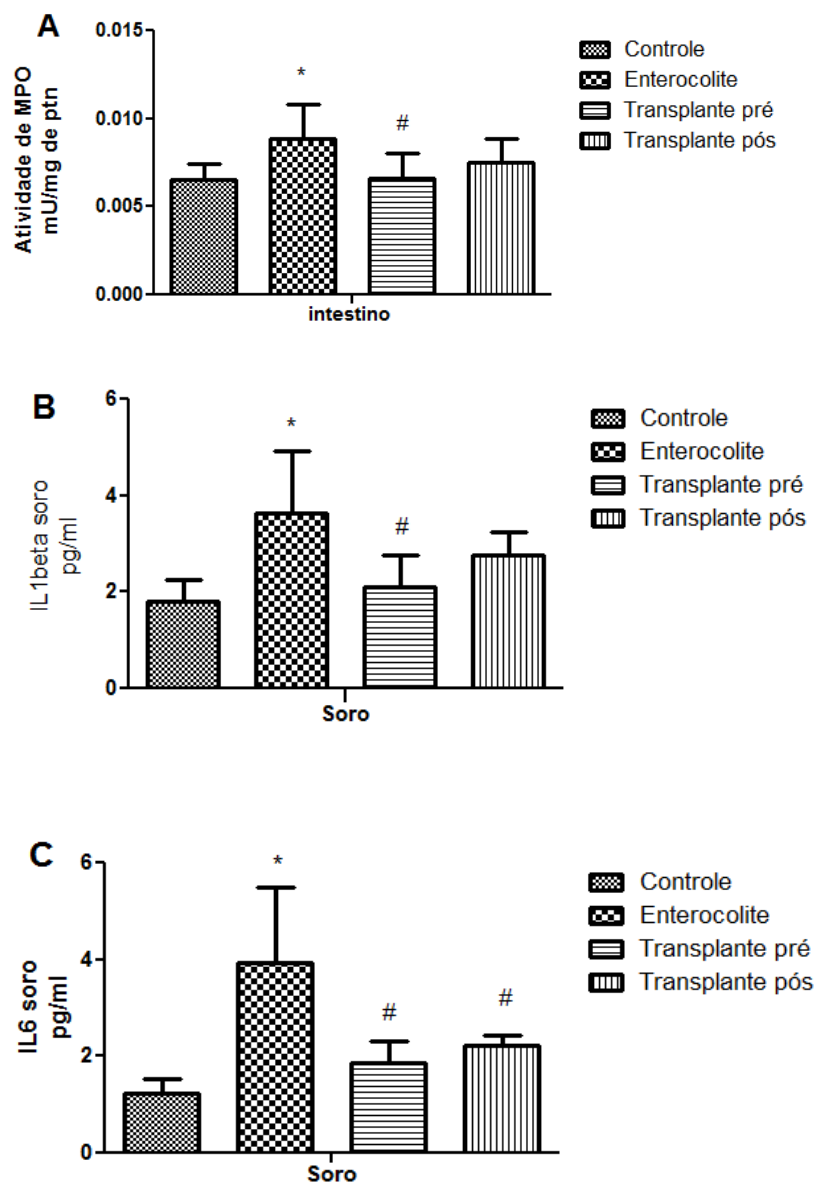
As variáveis contínuas serão apresentadas na forma de média \pm desvio padrão e comparadas com o teste t-Student, teste U de Mann-Whitney e análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey quando o F for significativo. Todos os testes foram realizados com auxílio do programa SPSS versão 20 e/ou GraphPad Prism 4.0. Em todas as análises foi adotado como nível para significancia estatística um p-valor $< 0,05$.

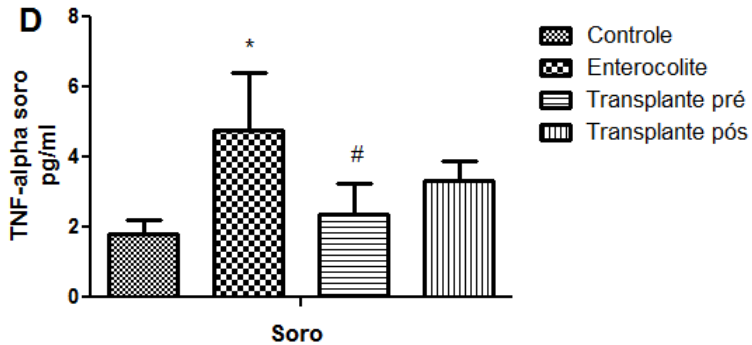
4. RESULTADOS

4.1. RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Na avaliação da resposta inflamatória sistêmica, o GS teve aumento significativo ($p < 0,05$) em relação ao GC nos níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6. O TMPE teve redução significativa ($p < 0,05$), em relação ao grupo sham nos níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6. O TMPO somente apresentou redução significativa ($p < 0,05$), nos níveis de IL-6, em relação ao GC. Na resposta inflamatória local, medindo a atividade da mieloperoxidase, o GS teve aumento significativo ($p < 0,05$) em relação ao GC. O TMPE teve redução significativa na atividade da mieloperoxidase ($p < 0,05$), em relação ao GS, enquanto o TMPO não apresentou diferença significativa.

Figura 4: Resposta inflamatória no intestino e soro de animais submetidos a enterocolite necrosante e tratados com transplante fecal. Atividade da Mieloperoxidase (A) e citocinas IL-1 β (B), IL-6 (C) e TNF α (D).



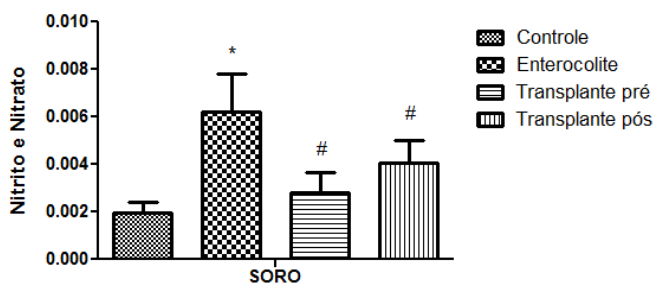
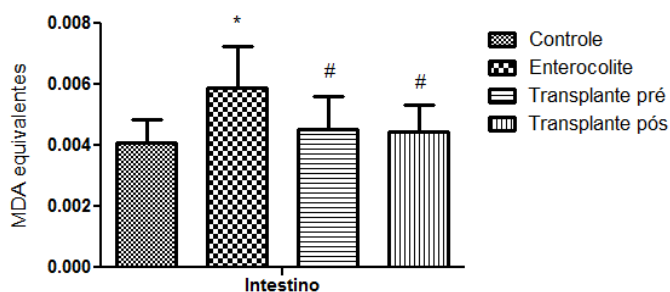
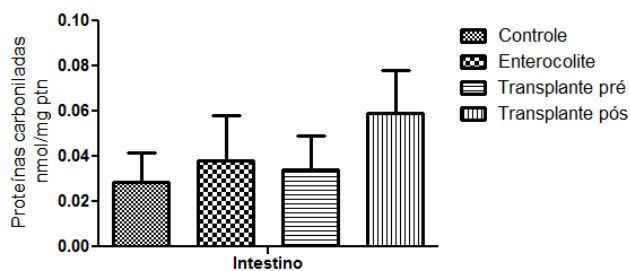


Análise da resposta inflamatória (atividade da mieloperoxidase e dos níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6) entre os grupos controle (GC), enterocolite (GS), transplante pré (TMPE) e transplante pós (TMPO). * em relação ao grupo controle; # em relação ao grupo sham ou enterocolite. Teste ANOVA de uma via, $p < 0,05$.

4.2 DANO OXIDATIVO E NITROSATIVO

A figura 3 apresenta os resultados referentes ao dano oxidativo em lipídeos (TBARS); níveis de nitrito e nitrato e dano em proteínas (Carbonil) de animais submetidos a enterocolite necrosante, tratados com transplante fecal. O grupo sham (ou enterocolite) teve aumento significativo ($p < 0,01$) dos níveis de TBARS e nitrito/nitrato em relação ao grupo controle. O TMPE e TMPO tiveram redução significativa destes níveis em relação ao grupo sham ($p < 0,05$). Não houve variação significativa entre os grupos em relação a carbonilação de proteínas.

Figura 5: (A) Dano oxidativo em proteínas em intestino(carbonil); (B) Dano oxidativo em proteínas (TBARS) em intestino de animais submetidos a enterocolite necrosante; (C) nitrito/nitrato em soro.

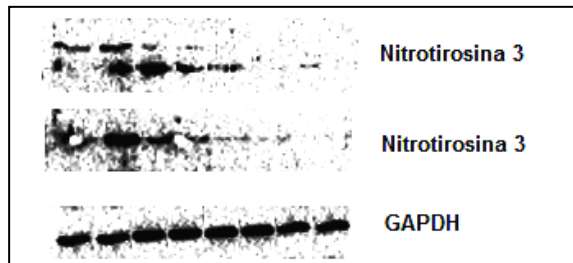
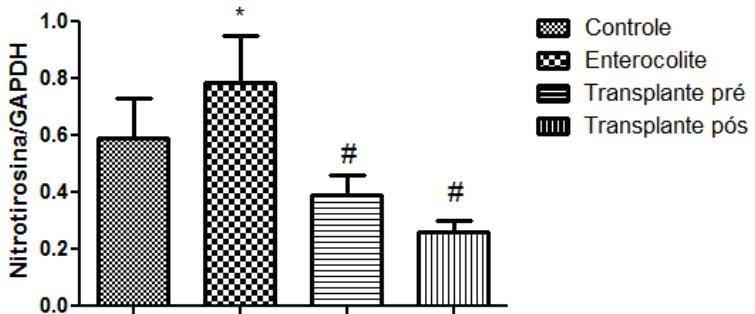


Análises entre os grupos controle (GC), enterocolite (GS), transplante pré (TMPE) e transplante pós (TMPO). (A) equivalente MDA, (B) nitrito e (C) carbonilação das proteínas. * em relação a controle; # em relação a enterocolite. ANOVA de uma via; $p < 0,05$.

4.3 NÍVEIS DE NITROTIROSINA

A figura 6 apresenta os níveis de nitrotirosina n-3 em intestino de animais submetidos a enterocolite necrosante, tratados com transplante fecal. O GS apresentou níveis de nitrotirosina n-3 significativamente maiores que o GC ($p < 0,05$). Tanto o TMPE quanto o TMPO apresentaram níveis significativamente menores de nitrotirosina n-3 que o GS ($p < 0,05$).

Figura 6: Níveis de nitrotirosina n-3 entre os grupos.



Legenda: Níveis de nitrotirosina n-3 em intestino de animais submetidos a enterocolite necrosante, tratados com transplante fecal. Ordem das bandas: controle, controle, enterocolite, enterocolite, transplante pré, transplante pré,

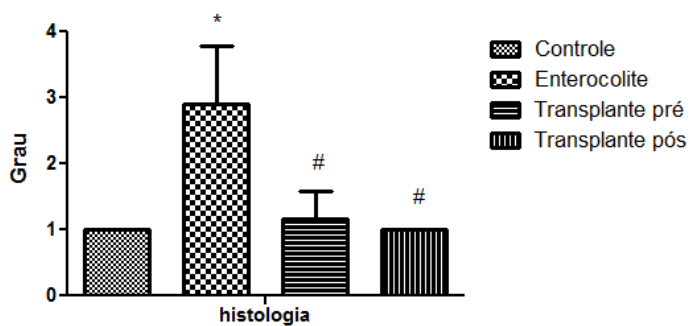
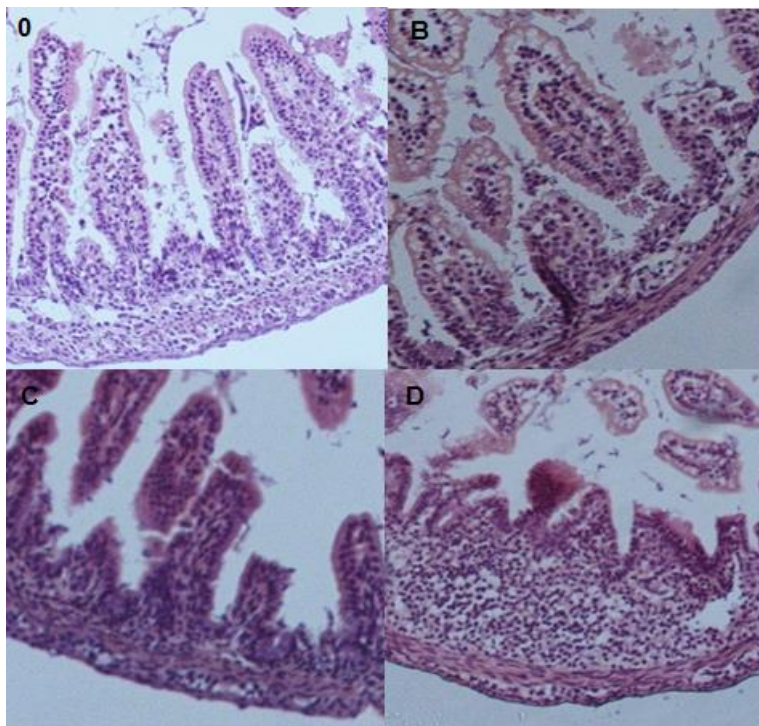
transplante pós, transplante pós. Dados apresentados como Nitrotirosina n-3/GAPDH. * em relação a controle; # em relação a enterocolite. ANOVA de uma via, $p < 0,05$.

4.4 LESÃO HISTOLÓGICA

A figura 4 apresenta amostras das imagens histológicas dos graus de lesão da mucosa intestinal apresentados pelos espécimes e um gráfico das médias dos grupos. A avaliação foi realizada por dois médicos patologistas, que interpretaram os resultados e graduaram as lesões conforme sistema desenvolvido por Caplan et al., (1994). Os avaliadores desconheciam o grupo de origem de cada lâmina. Nesse sistema o grau 0 é considerado normal, sem lesão; o grau 1 quando há separação ou elevação da mucosa; grau 2 quando há edema e lesão da mucosa até o nível da metade da vilosidade intestinal; grau 3 quando há necrose de toda vilosidade intestinal e grau 4 quando há necrose transmural.

O grupo sham, o qual sofreu indução de enterocolite sem tratamento, apresentou graus de lesão, de 1 a 3, tendo um aumento significativo ($p < 0,05$), em relação ao grupo controle nos níveis de lesão de mucosa intestinal identificados. Os grupos TMPE e TMPO, apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) em relação ao GS, nos graus de lesão intestinal identificados, apresentando predominantemente grau 0 de lesão. Não houve nenhum caso de lesão transmural, equivalente então a grau 4, em nenhum dos grupos.

Figura 7: Imagens apresentando os diferentes graus de lesão em intestino saudável (grau 0) e com enterocolite necrosante (B, C e D). O gráfico apresenta a média do grau de lesão em cada grupo.



Legenda: Imagens histológicas em H&E de lesão de mucosa intestinal, com magnificação x20. A= Grau 0, B= Grau 1, C= Grau 2, D= Grau 3. * em relação ao grupo controle; # em relação ao grupo enterocolite ou sham. ANOVA de uma via, $p < 0,05$

5. DISCUSSÃO

A prevenção e tratamento da enterocolite necrosante persiste um desafio, principalmente pela sua etiologia multifatorial, e pela necessidade de se entender melhor sua patogênese (Mollen et al, 2008; Högberg et al, 2013; Karadag et al, 2015; Besner, 2015). Atualmente entende-se como os principais causadores da doença a imaturidade intestinal e a desbiose (Tanner et al., 2015). A imaturidade da defesa imune e um ambiente de desbiose, levam a reações inflamatórias exacerbadas, o que por sua vez causam uma ruptura da barreira mucosa intestinal (Coran, 2012). O período neonatal é caracterizado por importante susceptibilidade a reações inflamatórias mais intensas e sustentadas (Rentea et al., 2013). Essa susceptibilidade foi demonstrada em modelos murinos de isquemia/reperfusão, comparando a resposta inflamatória de ratos neonatais com adultos (Yu et al., 2015).

A barreira mucosa intestinal no RN prematuro, possui seus mecanismos de proteção ainda pouco desenvolvidos, o intestino como um todo apresenta motilidade diminuída, com menos secreções gástricas, pancreáticas e biliares. O neonato prematuro apresenta ainda uma redução na concentração de enzimas proteolíticas e IgA polimérica, propiciando ainda mais a proliferação de bactérias patogênicas (Radulescu, 2009; Coran, 2012; Rentea et al, 2013; Besner, 2015). Estudos em modelos animais têm demonstrado que embora o desfecho histológico da NEC se apresente como necrose de coagulação, a mucosa intestinal sofre um processo de apoptose já no início da doença, impedindo também os mecanismos naturais de regeneração epitelial (Feng et al, 2007; de Souza, 2008; Perrone et al., 2010). O entendimento corrente é que a ruptura da barreira intestinal mucosa ocorre devido aos estressores fisiológicos perinatais, os quais provocam temporariamente isquemia intestinal, devido episódios de hipóxia, hipotensão e hipotermia. Essa ruptura seria o gatilho que leva a ativação da cascata inflamatória, estresse oxidativo e por fim a NEC (Feng et al, 2007; Özdemir et al, 2011; Coran, 2012; Karadag et al, 2015).

Ao observar que a apoptose ocorre no início da doença, e esse processo é regulado por sinalização celular, é provável que essa sinalização seja o gatilho cujo desfecho será a ruptura da membrana mucosa. Desta forma, os episódios de isquemia intestinal levam a formação de espécies reativas de oxigênio, produção de citocinas inflamatórias, que por sua vez induzem a formação de espécies reativas de nitrogênio (Feng et al., 2006; Özdemir et al., 2011; Rentea et al., 2013; Heinzerling et al., 2014). As citocinas pró-inflamatórias e as

espécies reativas de nitrogênio podem induzir apoptose acelerada nas vilosidades intestinais, impedindo a cicatrização da mucosa, bem como interrompendo a cascata de sinalização dos mecanismos de reparo tecidual (Feng et al., 2006; Özdemir et al., 2011; Coran, 2012). Assim para avaliar experimentalmente a NEC, são analisadas as citocinas pró-inflamatórias, as medidas de dano oxidativo, nitrosativo, e grau de lesão histológica (de Souza, 2008; Hogberg et al., 2013; Bergholz et al., 2013; Rentea et al., 2013; Benkoe et al., 2014a; Benkoe et al., 2014b; Heinzerling et al., 2014; Karadag et al., 2015).

Para o estudo da fisiopatogênese da NEC são utilizados vários modelos animais, cada um deles possui alguma vantagem em mimetizar algum aspecto da doença no ser humano, contudo todos possuem limitações. Os modelos animais carecem de diversidade genética, estão sujeitos a um ambiente de desenvolvimento estacionário, e não possuem um desenvolvimento imune e intestinal idênticos aos humanos (Tanner et al., 2015). Apesar disso, cada modelo é útil para analisar algum mecanismo específico da doença, como por exemplo o modelo de isquemia/reperfusão, onde o espécime sofre um clameamento temporário dos vasos mesentéricos, para investigar o papel do estresse oxidativo na lesão intestinal (Tanner et al., 2015; Yu et al., 2015).

O modelo que foi utilizado no experimento é conhecido como de gavagem/hipóxia. Ele envolve dieta artificial hiperosmolar, hipóxia, hipotermia, e administração de LPS por gavagem. Originalmente a descrição previa que os ratos deveriam nascer por cesariana, entre o 20º e 21º dia de gestação (Barlow et al., 1974), contudo foi recentemente simplificado para utilizar ratos neonatais, e desta forma foi realizado no experimento (Besner, 2015; Tanner et al., 2015). Apresenta como vantagem, um mecanismo fisiopatológico e alterações histológicas semelhante ao que ocorre no RN que desenvolve NEC, bem como tem sido usado para relacionar os vários componentes dos sistema imune inato e sinalização celular na doença (Tanner et al., 2015). Como desvantagem apresenta a variabilidade entre os grupos de pesquisadores no tipo fórmula alimentar, na modalidade de hipóxia e no momento de administração de LPS, o que pode dificultar a comparação entre os resultados. No caso, o modelo que foi realizado no experimento era semelhante ao de Barlow et al., (1974) e Besner et al., (2006), com a hipóxia sendo realizada com nitrogênio 100%, fórmula alimentar com a mesma composição, e administração de LPS após 24h de vida.

Foi possível confirmar a efetividade do modelo, pois o GS apresentou alterações histológicas compatíveis com as descrições prévias da literatura, apresentando lesões de grau 1 a 3, conforme

classificação de Caplan et al., (1994), e semelhantes ao que ocorre no recém-nascido humano a nível da mucosa (Tanner et al., 2015). O GS apresentou significativamente maiores graus de lesão de mucosa intestinal, na histologia, do que o grupo controle ($p<0,05$). O GS também apresentou aumento significativo, em relação ao GC, das citocinas pró-inflamatórias, TNF- α , IL-1 β e IL-6 ($p<0,05$). Apresentou aumento significativo em relação ao GC na atividade da mieloperoxidase, medindo desta forma a infiltração neutrofílica ($p<0,05$).

O GS teve um aumento significativo comparativamente ao controle em relação ao dano oxidativo ($p<0,05$), medido pela peroxidação lipídica em equivalentes MDA. Apresentou também um aumento significativo em relação ao controle no dano proteico por espécies reativas de nitrogênio, medido pelos níveis de nitrotyrosina n-3 ($p<0,05$), bem como apresentou aumento sérico dos níveis de óxido nítrico em relação ao controle ($p<0,05$).

A sinalização que leva a mucosa intestinal a uma resposta inflamatória envolve a interação entre PRR e PAMP, ou seja, entre a microbiota intestinal e a barreira mucosa intestinal (Janeway et al., 2002; Coran, 2012; Tanner et al., 2015). Essa microbiota, por sua vez, ao interagir com os receptores toll-like (TLR), vai permitir que a célula desenvolva tolerância, trazendo o equilíbrio entre os estímulos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios (Berrington et al., 2014). Os TLR ativados por uma microbiota hostil, vão iniciar uma cascata de sinalização intracelular, que leva por fim a translocação nuclear do NF- κ B e ativação transcricional de genes de resposta pró-inflamatória (de Souza, 2008; Mollen et al., 2008; Zhou et al., 2014). As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio também são capazes de aumentar a translocação nuclear do NF- κ B, levando também a ativação de genes de resposta inflamatória (de Souza, 2008; Karadag et al, 2015; Tanner et al., 2015).

A resposta inflamatória aguda e as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são fundamentais para a ruptura da barreira mucosa intestinal, que por fim leva a NEC. A administração de medicamentos e substâncias que promovem os sistemas celulares antioxidantes reduzem a severidade da NEC, conforme estudos em modelos animais (Ergun et al., 2007; Özdemir et al, 2011; Ozdemir et al., 2012; Sheng et al., 2013; Karadag et al., 2015). A sinalização celular, através dos PRR, principalmente os TLR, provocam resposta inflamatória e alimentam o estresse oxidativo. Em modelos murinos foi demonstrado que essa sinalização, principalmente pelo TLR4 e seus

correceptores CD14 e MD2, são importantes para o desenvolvimento da doença, visto que ratos *knockout* são aparentemente protegidos de desenvolver NEC (Mollen et al., 2008; Carlisle et al., 2013).

A mudança da microbiota intestinal decorrente do tratamento na UTINeo, exerce papel importante no desenvolvimento de NEC (Wang et al., 2009; Burke et al., 2013; Torazza et al., 2013; Berrington et al., 2014; Patole et al., 2014; Tanner et al., 2015). O ambiente intestinal do RN é estéril ao nascimento. Os RNs são expostos às bactérias do ambiente, do leite materno, do canal vaginal, e mesmo das fezes de suas mães para o desenvolvimento normal de sua microbiota (Feng et al., 2007; de Souza, 2008; Carlisle et al., 2013; Tanner et al. 2015). A utilização de enemas nas parturientes para diminuir a contaminação no parto, não demonstra qualquer benefício ao feto, ou a própria progenitora (Revez et al., 2013). Os prematuros estão em grande risco de desbiose pois frequentemente nascem por cesariana, são alimentado por fórmula artificial, recebem com frequência antibióticos, sofrem procedimentos invasivos e permanecem em um ambiente onde os microorganismos são mais resistentes e patogênicos (de Souza, 2008; Coran, 2012; Tanner et al., 2015).

Membros da família das enterobactérias, clostrídios, enterococos, estafilococos coagulase-negativos, *Salmonella* e até fungos têm sido relacionados a NEC (Wang et al., 2009; Torazza et al., 2013; Burke et al., 2013; Carlisle et al., 2013; Berrington et al., 2014; Heinzerling et al., 2014; Patole et al., 2014). Mesmo assim, nenhum deles pôde ser implicado isoladamente como o causador da patologia. Recentemente, com o uso de técnicas de moleculares de avaliação da microbiota fecal de neonatos prematuros, antes e durante o desenvolvimento da doença, foi possível observar uma mudança no padrão de colonização bacteriana com predomínio de proteobactérias e diminuição de sua diversidade (Torazza et al., 2013; Jenke et al., 2013; Carlisle et al., 2013; Patole et al., 2014; Tanner et al., 2015).

A pesquisa do papel da microbiota nas doenças inflamatórias sofreu grande estímulo pelo desenvolvimento de técnicas que prescindem da cultura de bactérias, como as técnicas de sequenciamento genético (Carlisle et al., 2013). Cada vez se observam mais estudos sobre o papel da microbiota em doenças como a diabetes tipo 2 (He et al., 2015), doenças inflamatórias ou de motilidade intestinal (Berg et al., 2015), obesidade (Jayasinghe et al., 2016) e esteatose hepática não alcóolica (Konturek et al., 2015). A ponto da existência hoje do Projeto Genoma do Microbioma Humano, que busca vai permitir a identificação

molecular de espécies difíceis ou impossíveis de serem identificadas por cultura bacteriana (Torrazza et al., 2013).

O leite materno é importante para proteção contra NEC, protegendo o RN da desbiose, permitindo desenvolvimento de comensais microbianos, trazendo várias substâncias como imunoglobulinas e relaxinas (de Souza, 2008; Matheson et al., 2014; Patole et al., 2014). Contudo, nem todas as mães podem ou conseguem fornecer leite para os seus filhos na UTINeo, e a maioria destas unidades não possui banco de leite materno (de Souza, 2008). Uma alternativa que vem sendo estudada, para suprir esta falta, seria a administração de probióticos junto da fórmula artificial. Embora esteja em uso em alguns centros médicos, e tenha se mostrado segura, infelizmente não demonstrou redução significativa nos episódios de sepse, ou na NEC (Srinivasiois et al., 2009).

O sucesso do transplante de microbiota fecal (FMT), no tratamento da colite pseudomembranosa, também tem aberto todo um novo campo de possibilidades na modificação da microbiota, para o tratamento das doenças inflamatórias crônicas sistêmicas e locais (Burke et al., 2013). Isso tem estimulado pesquisadores a testar o transplante em outros modelos de doença inflamatória, já citados anteriormente, até que por fim na própria NEC (De Curtis et al., 2013; Berrington et al., 2014). Para o FMT em seres humanos, a maioria dos pesquisadores acredita que 50 a 100g de fezes são suficientes, administrados idealmente por endoscopia ou sonda nasogástrica, diluídas em soro fisiológico, com inibição da secreção ácida do estômago através do uso de um bloqueador da bomba de prótons (Konturek et al., 2015). No tratamento de colite pseudomembranosa, se observou que em 14 dias a microbiota se torna semelhante ao doador, com predomínio de *Bacteroides sp* no colon, e em alguns casos foram necessários dois FMT para cura da doença (Burke et al., 2013).

Nos modelos de estudo em animais, ainda não foram definidos padrões para o FMT em relação a quantidade e a concentração da solução, ambas variando bastante entre os estudos (Li et al., 2015; Konturek et al., 2015; Seekatz et al., 2015). Desde a utilização de 1 grama de fezes, quando o modelo é murino adulto, até a utilização por concentração estimada de bactérias por densidade óptica em modelos neonatais (Li et al., 2015; Seekatz et al., 2015). A coleta das fezes varia também entre a utilização de amostra de fezes já eliminadas, ou a retirada da mesma diretamente do ceco, sacrificando o rato doador. No experimento se optou por utilizar 100µl da solução de 3×10^8 células, o

que é semelhante ao modelo de Li et al, (2015), sendo retiradas as fezes diretamente do ceco do rato adulto doador.

O grupo TMPE, recebendo no primeiro dia de vida o transplante de microbiota fecal e fórmula artificial, sendo submetido a indução de NEC após 24h dos nascimento apresentou valores significativamente menores de TNF- α , IL-1 β e IL-6 no soro, bem como de atividade da mieloperoxidase no intestino, em relação ao GS ($p<0,05$). Aparentemente, a resposta inflamatória sistêmica e local foram menores com o FMT. Ao analisar a presença de ON no soro, utilizando a concentração de nitrito/nitrato, o grupo TMPE apresentou valores significativamente menores que o GS ($p<0,05$), demonstrando que a concentração de substrato para produção de espécies reativas de nitrogênio a nível sistêmico, se encontravam menores.

No intestino, as medidas de dano oxidativo em lipídeos por TBARS, e nitrosativo por medida de nitrotirosina n-3, foram significativamente menores no grupo TMPE que no GS ($p<0,05$). Demonstrando que localmente houve uma redução significativa no dano causado por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Na histologia, pode-se observar que o modelo apresentou, na graduação de Caplan et al., (1994), valores significativamente inferiores que o GS ($p<0,05$). Com estes dados, entende-se que o FMT no modelo apresentou potencial anti-inflamatório e antioxidante, podendo ser protetor para o desenvolvimento de NEC no mesmo.

O grupo TMPO, recebendo o FMT mais tardiamente, 36 horas após o nascimento, apresentou valores significativamente menores de IL-6 no soro ($p<0,05$). Os níveis aumentados de IL-6 em recém-nascidos com NEC, são considerados como fatores de mau prognóstico, associados a um aumento da mortalidade (Bregholz et al., 2013). A administração do FMT demonstrou-se ser capaz de reduzir, neste parâmetro, a resposta inflamatória sistêmica.

Ao analisar a presença de ON no soro, utilizando a concentração de nitrito/nitrato, o grupo TMPO apresentou valores significativamente menores que o GS ($p<0,05$), demonstrando ser capaz , também , de reduzir que a concentração de substrato para produção de espécies reativas de nitrogênio a nível sistêmico.

No intestino, as medidas de dano oxidativo em lipídeos por TBARS, e nitrosativo por medida de nitrotirosina n-3, foram significativamente menores no grupo TMPO que no GS ($p<0,05$). Demonstrando que localmente houve uma redução significativa no dano causado por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Na histologia, pode-se observar que o modelo apresentou, na graduação de Caplan et

al., (1994), valores significativamente inferiores que o GS ($p < 0,05$). Com estes dados, é possível observar que o FMT no modelo realizado mais tardiamente possui menor potencial anti-inflamatório que o modelo onde o transplante é realizado precocemente. O transplante realizado após a administração de LPS, apresentou potencial antioxidante e foi capaz de reduzir o grau de lesão histológica.

A medida da lesão oxidativa por formação de proteínas carboniladas foi o único parâmetro que não se modificou significativamente em todos os grupos, isso pode ser explicado pelo fato de a técnica de carbonil mensurar danos somente pelo grupamento carbonila da estrutura proteica, e o dano pode estar em outros grupamentos como o sulfidrila. Para se ter essa resposta outras análises deveriam ter sido realizadas. Os ácidos nucleicos são positivos para carbonil, e contaminação dos extratos, por terem mais resposta inflamatória e possivelmente proliferação bacteriana, poderia ser a causa da tendência de aumento no grupo TMPO (Wehr e Levine 2013).

Uma crítica ao experimento, e mesmo aos modelos no qual foi baseado, se refere ao critério de sacrifício antes de 72 horas de vida. Ele é realizado, como descrito nos materiais e métodos, na presença de critérios clínicos, como: sangue nas fezes, gasping ou distensão abdominal significativa. Embora isso possa ser um fator de viés, o qual foi uma preocupação dos membros do laboratório envolvidos no experimento, é interessante observar que os animais apresentaram clínica muito semelhante ao que ocorre clinicamente no neonato, com prostração, palidez e má-perfusão. Portanto, foi bastante segura a decisão do sacrifício, sem esses critérios, provavelmente seriam necessários o dobro de espécimes.

No experimento realizado houve um significativo efeito anti-inflamatório e antioxidante do FMT, quando realizado no primeiro dia de vida. São necessários mais estudos para identificar como a microbiota como um todo se organiza na interação com os PRR. Como funciona o mecanismo de tolerância e mesmo o de sinalização celular com efeito anti-inflamatório. Embora se esteja supondo que a modificação da microbiota pelo FMT, realize sua ação anti-inflamatória e antioxidante no modelo, através dos PRR, principalmente os TLR, pode ser que existam outros mecanismos. Seria interessante mensurar a concentração de TLR, caspases e NF- κ B nos grupos estudados.

Para prevenção da NEC o maior fator de risco a evitar é a prematuridade (Hogberg et al., 2013; Heinzerling et al 2014; Berrington et al., 2014; Yi et al, 2015; Besner, 2015). Naqueles casos em que esta prevenção não foi possível, modular o desenvolvimento da microbiota e

utilizar leite materno, evitando as fórmulas artificiais poderia diminuir as chances do RN desenvolver NEC.

É difícil imaginar que o FMT possa ser usado como prevenção em neonatos, visto todas as dificuldades éticas e mesmo culturais impostas. O uso das técnicas de moleculares de avaliação da microbiota fecal de neonatos prematuros e à termo, pode elucidar um padrão de microbiota mais protetor. Deste padrão poderiam ser feitas culturas e até medicamentos semelhantes aos probióticos.

Em humanos o FMT eventualmente apresenta resultados aquém dos desejados devido a variação importante na colonização bacteriana entre diferentes pacientes (Burke et al., 2013; Li et al., 2015). Ao encontro desse problema, já existem estudos experimentais em animais, com um modelo de transplante de consórcio bacteriano misturado, o qual evita a variação que ocorre no FMT, apresentando resultados promissores no tratamento da desbiose (Li et al., 2015).

Após a doença iniciada, o FMT demonstrou efeito anti-inflamatório sistêmico, ainda que menos importante do que no grupo de transplante de microbiota precoce. Contudo, teve efeito antioxidante e de diminuição na lesão histológica significativos. Possivelmente somado ao uso de antibióticos, e um suporte avançado de vida adequado, ele poderia ser mais eficiente. Corrigir a desbiose associada a outras medidas clínicas pode ser uma estratégia promissora no tratamento da NEC, o que vai de encontro com o tratamento preconizado hoje, pois o mesmo prega jejum absoluto (de Souza, 2008; Coran, 2012).

As mesmas perguntas sobre o transplante de microbiota fecal no tratamento de colite pseudomembranosa, diabetes, e outras enfermidades, valem para o experimento realizado. Novos estudos são necessários para encontrar respostas como: qual a quantidade ideal de FMT, qual a melhor forma de administração, se é necessário repetir o transplante e a que intervalo, qual segurança em pacientes imunodeprimidos, como se compara com as terapêuticas existentes, e finalmente, se é interessante acrescentá-lo ao tratamento padrão (Burke et al., 2013; De Curtis et al.; Li et al., 2015).

Em termos de diagnóstico precoce da NEC, muito se avançou com adição de ultrassonografia, e dosagens de novos marcadores inflamatórios nos RN. Esses marcadores estão sendo associados a prática clínica, como por exemplo, proteína C reativa (PCR), Calcitonina, IL8, I-FABP, do inglês *intestinal-type fatty acid-binding*, e L-FABP, do inglês *liver-type fatty acid-binding protein* (de Souza, 2008; Coran, 2012; Gonçalves et al., 2015). O L-FABP e I-FABP são marcadores de lesão intestinal, sendo mais específicos e úteis para o

diagnóstico precoce (Gonçalves et al., 2015). Embora o diagnóstico precoce otimize o tratamento, a mortalidade não foi modificada significativamente nos últimos 20 anos (Benkoe et al., 2014a). O nascimento e sobrevivência de recém-nascidos cada vez mais prematuros, traz consigo o aumento da incidência da doença, fazendo presente a necessidade de novos métodos de prevenção e tratamento (Mollen et al., 2008; Radulescu et al, 2009). Possivelmente o estudo da microbiota e do FMT possam ser úteis no desenvolvimento de novas estratégias e protocolos de tratamento.

6. CONCLUSÃO

A enterocolite necrosante no RN prematuro ocorre devido a ruptura da barreira mucosa intestinal. Essa ruptura é mediada pela produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, bem como por uma resposta inflamatória exagerada. Os episódios de isquemia, hipóxia e reperfusão levam ao estresse oxidativo e nitrosativo, os quais secundariamente causam a reação inflamatória. Um ambiente luminal onde ocorre desbiose leva a sinalização pró-inflamatória através dos receptores de reconhecimento de padrões.

O estudo buscou, através de um modelo neonatal murino de indução de enterocolite necrosante, identificar se a modificação desta sinalização, através de um transplante de microbiota fecal de um rato doador adulto, possuía um efeito anti-inflamatório e antioxidante. No estudo foi possível confirmar a eficiência do modelo de simulação de enterocolite, o qual provocou resposta inflamatória, dano oxidativo e nitrosativo no grupo que o recebeu.

O experimento demonstrou efeito anti-oxidante e anti-inflamatório significativo no grupo que recebeu o transplante logo após o nascimento, demonstrando ter um efeito protetor para o desenvolvimento de NEC no mesmo. Já o grupo que recebeu o transplante após o protocolo de indução de enterocolite, obteve uma resposta anti-inflamatória sistêmica menos significativa, enquanto demonstrou efeito antioxidante significativo. Desta forma, o transplante mais tardio apresentou efeito terapêutico também neste modelo. Ambos os grupos obtiveram menores graus de lesão histológica que o grupo sem tratamento e que sofreu indução de enterocolite.

Ainda que novos estudos sejam fundamentais para aprimorar o transplante de microbiota fecal, abre-se um campo vasto para investigação da fisiopatologia da enterocolite necrosante. Associado a

esse fato, podem ser desenvolvidos novos métodos de prevenção, e tratamento para a doença, baseados na modulação da microbiota e tratamento da desbiose.

REFERÊNCIAS

Alfaleh K, Anabrees J, Bassler D, Al-Kharfi T. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011; (3):CD005496.

Barlow B, Santulli TV, Heird WC, Pitt J, Blanc WA, Schullinger JN. An experimental study of acute neonatal enterocolitis - the importance of breast milk. *J Pediatr Surg*. 1974; 9:587-95.

Benkoe T, Reck C, Pones M, Weninger M, Gleiss A, Stift A, Rebhandl W. Interleukin-8 predicts 60-day mortality in premature infants with necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg*. 2014; 49:385–9.

Benkoe TM, Mechtler TP, Weninger M, Pones M, Rebhandl W, Kasper DC. Serum levels of interleukin-8 and gut-associated biomarkers in diagnosing necrotizing enterocolitis in preterm infants. *J Pediatr Surg*. 2014; 49:1446–51.

Berg D, Clemente JC, Colombel JF. Can inflammatory bowel disease be permanently treated with short-term interventions on the microbiome? *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015; 9(6):781-95.

Bergholz R, Zschiegner M, Eschenburg G, Wenke K, Tiemann B, Roth B, Appl B, Reinshagen K, Sommerfeldt D, Ridderbusch I. Mucosal loss with increased expression of IL-6, IL-8, and COX-2 in a formula-feeding only neonatal rat model of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg*. 2013; 48:2301–7.

Berrington JE, Stewart CJ, Cummings SP, Embleton ND. The neonatal bowel microbiome in health and infection. *Curr Opin Infect Dis*. 2014; 27:236–43.

Besner GE. A pain in the NEC: Research challenges and opportunities. *J Pediatr Surg*. 2015; 50:23–9.

Björkström MV, Hall L, Söderlund S, Håkansson EG, Håkansson S, Domellöf M. Intestinal flora in very low-birth weight infants. *Acta Paediatr.* 2009; 98(11):1762-7.

Burke KE, Lamont JT. Fecal transplantation for recurrent *clostridium difficile* infection in older adults: A review. *J Am Geriatr Soc.* 2013; 61(8):1394-8.

Canxia H, Yujuan S, Wei S. Targeting gut microbiota as a possible therapy for diabetes. *Nutrition Research.* 2015; 35(5):361-7.

Carlisle EM, Morowitz MJ. The intestinal microbioma and necrotizing enterocolitis. *Curr Opin Pediatr.* 2013 Jun;25(3):382-7.

Caplan MS, Hedlund E, Adler L, et al. Role of asphyxia and feeding in a neonatal rat model of necrotizing enterocolitis. *Pediatr Pathol.* 1994;14:1017-28.

Coran AG. 7rd. *Pediatric Surgery: Necrotizing Enterocolitis.* Philadelphia: Elsevier 2012, 1187-1207p.

Dasopoulou M, Briana DD, Boutsikou T, Karakasidou E, Roma E, Costalos C, Malamitsi-Puchner A. Motilin and gastrin secretion and lipid profile in preterm neonates following prebiotics supplementation: a double-blind randomized controlled study. *J Parenter Enteral Nutr.* 2015; 39:359–68.

De Curtis M, Terrin G. Necrotizing enterocolitis (NEC): what's goig on. *J Pediatr Neonat Individual Med.* 2013; 2(2):e020218.

De Oliveira MR, Lorenzi R, Schnorr CE, Morrone M, Moreira JC. Increased 3-nitrotyrosine levels in mitochondrial membranes and impaired respiratory chain activity in brain regions of adult female rats submitted to daily vitamin A supplementation for 2 months. *Brain Res Bull.* 2011; 86(3-4):246-53.

De Souza, JCK. *Cirurgia pediátrica – teoria e prática: Enterocolite Necrosante.* São Paulo: Editora Roca 2008, 75c, 385-97p.

Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990; 186:421–31.

Ergün O, Ergün G, Öktem G, Selvi N, Doğan H, Tunçyürek M, Saydam G, Erdener A. Enteral resveratrol supplementation attenuates intestinal epithelial inducible nitric oxide synthase activity and mucosal damage in experimental necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg.* 2007; 42:1687–94.

Feng J, Assal ONE, Besner GE. Heparin-binding epidermal growth factor–like growth factor reduces intestinal apoptosis in neonatal rats with necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg.* 2006; 41:742–47.

Feng J, Besner GE. Heparin-binding epidermal growth factor–like growth factor promotes enterocyte migration and proliferation in neonatal rats with necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg.* 2007; 42:214–20.

Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982; 126:131–138.

Halliwell B, Gutteridge JMC. 3rd. Free radicals in biology and medicine. Oxford, London, 1999.

Heinzerling NP, Liedel JL, Welak SR, Fredrich K, Biesterveld BE, Pritchard Jr KA, Gourlay DM. Intestinal alkaline phosphatase is protective to the preterm rat pup intestine. *J Pediatr Surg.* 2014; 49:954–60.

Högborg N, Stenbäck A, Carlsson PO, Wanders A, Lilja HE. Genes regulating tight junctions and cell adhesion are altered in early experimental necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg.* 2013; 48:2308–12.

Jayasinghe TN, Chiavaroli V, Holland DJ, Cutfield WS, O'Sullivan JM. The New Era of Treatment for Obesity and Metabolic Disorders: Evidence and Expectations for Gut Microbiome Transplantation. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016; 19:6-15.

Janeway CA, Medzhitov R. Innate Immune Recognition. Annual Review of Immunology. 2002; 20:197–216.

Jenke AC, Postberg J, Mariel B, Hensel K, Foell D, Däbritz J, Wirth S. S100A12 and hBD2 correlate with the composition of the fecal microflora in elbw infants and expansion of *E. coli* is associated with NEC. Biomed Res Int. 2013; 150372.

Karadag A, Ozdemir R, Kurt A, Parlakpınar H, Polat A, Vardi N, Taslidere E, Karaman A. Protective effects of dexpanthenol in an experimental model of necrotizing enterocolitis. J Pediatr Surg. 2015; 50:1119–24.

Konturek PC, Haziri D, Brzozowski T, Hess T, Heyman S, Kwiecien S, Konturek SJ, Koziel J. Emerging role of fecal microbiota therapy in the treatment of gastrointestinal and extra -gastrointestinal diseases. J Physiol Pharmacol. 2015; 66(4):483-91.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Methods Enzymol. 1990; 186:464–78.

Li J, Wu J, Du L, Hu Y, Yang X, Mu D, Xia B. Different antibiotic strategies in transient tachypnea of the newborn: an ambispective cohort study. Eur J Pediatr. 2015; 174(9):1217-23.

Li M, Liang P, Li Z, Wang Y, Zhang G, Gao H, Wen S, Tang L. Fecal microbiota transplantation and bacterial consortium transplantation have comparable effects on the re-establishment of mucosal barrier function in mice with intestinal dysbiosis. Front Microbiol. 2015;7(6):692.

Lowry OH, Rosebrough AL, Randal RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951; 193:265–75.

Marett M, Tóth S, Jonecová Z, Veselá J. Impact of alanyl-glutamine dipeptide on proliferative and inflammatory changes in jejunal mucosa after acute mesenteric ischemia. J Pediatr Surg. 2014; 49:1385–9.

Matheson PJ, Walker SK, Maki AC, Shaheen SP, Garrison RN, Downard CD. Oral relaxin maintains intestinal blood flow in a rat model of NEC. J Pediatr Surg. 2014; 49:961–5.

Mollenb KP, Gribarb SC, Anandb RJ, Kaczorowskib DJ, Kohlera JW, Branca MF, Dubowskia TD, Sodhia CP, Hackama DJ. Increased expression and internalization of the endotoxin coreceptor CD14 in enterocytes occur as an early event in the development of experimental necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg.* 2008; 43:1175–81.

Özdemir OMA, Ergin H, Yenisey C, Türk NS. Protective effects of Ginkgo biloba extract in rats with hypoxia/reoxygenation–induced intestinal injury. *J Pediatr Surg.* 2011; 46:685–90.

Ozdemir R, Yurttutan S, Sari FN, Uysal B, Unverdi HG, Canpolat FE, Erdeve O, Dilmen U. Antioxidant effects of N-acetylcysteine in a neonatal rat model of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg.* 2012; 47:1652–7.

Patole S, Keil AD, Chang A, Nathan E, Doherty D, Simmer K, Esvaran M, Conway P. Effect of Bifidobacterium breve m-16v supplementation on fecal bifidobacteria in preterm neonates - a randomised double blind placebo controlled trial. *PLoS ONE.* 2014; 9(3):e89511.

Perrone EE, Chen C, Longshore SW, Okezie O, Warner BW, Sun CC, Alaish SM, Strauch ED. Dietary bile acid supplementation improves intestinal integrity and survival in a murine model. *J Pediatr Surg.* 2010; 45:1256–65.

Radulescu A, Yu X, Orvets ND, Chen Y, Zhang HY, Besner GE. Deletion of the heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor gene increases susceptibility to necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surger.* 2010; 45:729–34.

Radulescu A, Zhang HY, Yu X, Olson JK, Darbyshire AK, Chen Y, Besner GE. Heparin-binding epidermal growth factor–like growth factor overexpression in transgenic mice increases resistance to necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg.* 2010; 45:1933–9.

Rentea RM, Liedel JL, Fredrich K, Pritchard Jr K, Oldham KT, Simpson PM, Gourlay DM. Enteral intestinal alkaline phosphatase administration in newborns decreases iNOS expression in a neonatal necrotizing enterocolitis rat model. *J Pediatr Surg.* 2013; 48:124–8.

Rentea RM, Liedel JL, Welak SR, Cassidy LD, Mayer AN, Pritchard Jr. KA, Oldham KT, Gourlayg DM. Intestinal alkaline phosphatase administration in newborns is protective of gut barrier function in a neonatal necrotizing enterocolitis rat model. *J Pediatr Surg.* 2012; 47:1135–42.

Reveiz L, Gaitán HG, Cuervo LG. Enemas during labour. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2013(7). Art. No.: CD000330.

Seekatz AM, Theriot CM, Molloy CT, Wozniak KL, Bergin IL, Young VB. Fecal Microbiota Transplantation Eliminates *Clostridium difficile* in a Murine Model of Relapsing Disease. *Infect Immun.* 2015; 83(10):3838-46.

Sheng Q, Lv Z, Cai W, Song H, Qian L, Wang X. Protective effects of hydrogen-rich saline on necrotizing enterocolitis in neonatal rats. *J Pediatr Surger.* 2013; 48:1697–706.

Sim K, Shaw AG, Randell P, Cox MJ, McClure ZE, Li MS, Haddad M, Langford PR, Cookson WOC, Moffatt MF, Kroll JS. Dysbiosis anticipating necrotizing enterocolitis in very premature infants. *Clinical Infec Dis.* 2015; 60(3):389–97.

Srinivasjois R, Rao S, Patole S. Prebiotic supplementation of formula in preterm neonates: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Clin Nutr.* 2009; 28(3):237-42.

Stewart CJ, Marrs ECL, Nelson A, Lanyon C, Perry JD, Embleton ND, Cummings SP, Berrington JE. Development of the preterm gut microbiome in twins at risk of necrotising enterocolitis and sepsis. *PLoS ONE.* 2013; 8(8):e73465.

Strauch ED, Wang JY, Bass BL. Bile salt stimulates intestinal epithelial cell migration through TGFbeta after wounding. *J Surg Res.* 2001; 97(1):49-53.

Tanner SM, Berryhill TF, Ellenburg JL, Jilling T, Cleveland DS, Lorenz RG, Matin CA. Pathogenesis of necrotizing enterocolitis: modeling the innate immune response. *Am J Pathol.* 2015 Jan;185(1):4-16.

Tatum Jr PM, Harmond CM, Lorenz RG, Dimmitt RA. Toll-like receptor 4 is protective against neonatal murine ischemia-reperfusion intestinal injury. *J Pediatr Surg*. 2010; 45:1246–55.

Torrazza RM, Ukhanova M, Wang X, Sharma R, Hudak ML, Neu J, Mai V. Intestinal microbial ecology and environmental factors affecting necrotizing enterocolitis. *PLoS ONE*. 2013; 8(12): e83304.

Wang Y, Hoenig JD, Malin KJ, Qamar S, Petrof EO, Sun J, Antonopoulos DA, Chang EB, Claud EC. 16S rRNA gene-based analysis of fecal microbiota from preterm infants with and without necrotizing enterocolitis. *ISME J*. 2009; 3(8):944-54.

Wehr NB, Levine RL. Quantification of protein carbonylation. *Methods Mol Biol*. 2013;965:265-81.

Yu Y, Klemann C, Feng X, Ginzel M, Vieten G, Lacher M, Ure B, Kuebler JF. Increased inflammatory reaction to intestinal ischemia-reperfusion in neonatal versus adult mice. *Eur J Pediatr Surg*. 2015; 25:46–50.

Zhou W, Li W, Zheng XH, Rong X, Huang LG. Glutamine downregulates TLR-2 and TLR-4 expression and protects intestinal tract in preterm neonatal rats with necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg*. 2014; 49:1057–63.

APÊNDICES

Apêndice I – APÊNDICE A – Aprovação no Comitê de Ética



Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **"Transplante de microbiota em modelo experimental murino de enterocolite neonatal"**, registrada com o protocolo nº **078/2016-1**, sob a responsabilidade de **Felipe Dal Pizzol**, junto à equipe: **Monique Michels, Pricila Ávila, Bruna Pescador** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de **26/07/2016**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	08/2016 a 04/2017
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogêneo neonatos Wistar
Nº de animais	60
Peso/idade	15-20 g / 1 dia
Sexo	Masculino
Origem	Biotério da UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:

Project title: **"Microbiota transplantation in murine experimental model of neonatal enterocolitis"**.


Protocol number: **078/2016-1**

Principal Investigator: **Felipe Dal Pizzol**

Researchers: **Monique Michels, Pricila Ávila, Bruna Pescador**.

The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesc.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.

Criciúma, 26 de julho de 2016.


Jairo José Zocche
Coordenador da CEUA

